

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/002514 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/17,  
39/395, 45/00, 48/00, A61P 35/00, 43/00, C12N 15/09,  
C07K 16/32, C12Q 1/02, 1/68(HONDA, Kohei) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市  
春日 3 丁目 1 5-1 9-3 0 2 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008036

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒  
104-0028 東京都中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡  
ビル 9 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 25 日 (25.06.2003)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-186799 2002 年 6 月 26 日 (26.06.2002) JP  
特願2002-186815 2002 年 6 月 26 日 (26.06.2002) JP(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 浩史  
(TANAKA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つく  
ば市 二の宮 4 丁目 6-3-4 0 4 Ibaraki (JP). 海江田  
功 (KAIEDA, Isao) [JP/JP]; 〒302-0023 茨城県 取手市  
白山 1 丁目 1-2 8-3 0 1 Ibaraki (JP). 本田 弘平添付公開書類:  
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR CANCER

(54) 発明の名称: 癌の予防・治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide preventives/remedies for cancer, etc. More specifically speaking, a compound or its salt inhibiting the activity of a protein having an amino acid sequence, which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or 16, a compound inhibiting the expression of a gene of the above protein, an antisense nucleotide containing a base sequence or a part thereof, which is complementary or substantially complementary to the base sequence of a DNA encoding the above protein or its peptide fragment, an antibody against the above protein or its peptide fragment, etc. are usable as preventives/remedies for cancer and apoptosis promoters.

(57) 要約: 本発明は、癌の予防・治療剤などを提供する。具体的には、配列番号: 1 または 16 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物、該タンパク質またはその部分ペプチドをコードする DNA の塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスヌクレオチド、該タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体などは、癌などの予防・治療剤、アポトーシス促進剤として使用することができる。

WO 2004/002514 A1

明細書  
癌の予防・治療剤

## 技術分野

- 5 本発明は、癌の予防・治療剤および診断薬などに関する。

## 背景技術

- 最近の研究の進展によって、癌は、複数の遺伝子変異が体細胞に蓄積し、その結果として細胞の増殖制御ができなくなる遺伝子の病気であることが証明されて
- 10 きている。これらのうち、p53はヒト癌で最も高頻度に異常が検出されている癌抑制遺伝子であり、G1 arrest、アポトーシスの誘導、DNAに傷を受けた場合のチェックポイント機構など多様な生理機能を有していることが明らかにされている。これらの機能は、p53タンパク質が転写因子として作用し、その標的遺伝子の発現制御を行うことにより発揮されるものと考えられている。そのため、p53に
- 15 異常が生じる（変異型p53）と、これらの作用が発揮されなくなり、細胞は癌化に進んでいくと考えられる。一方、p53を欠失している癌細胞に、変異型p53を導入すると、癌細胞が軟寒天中でもコロニーを形成する、あるいは胆癌ヌードマウスモデルで腫瘍を形成するようになる（ネイチャージェネティクス、4巻、42-46頁、1993年）等の報告から、変異型p53は、ただ単に正常なp53（野生型p53）の
- 20 機能を失うだけではなく、変異型p53自身が、積極的に癌化に関わっていることが示唆されている。さらに、この変異型p53も野生型p53と同様に、下流遺伝子を誘導することが報告されている（オンコジーン、12巻、1941-1952頁、1996年）。変異型p53は、変異している位置の相違によりいくつかのタイプに分かれるが、1
- 25 75番目のアルギニン（R）がヒスチジン（H）に置換した変異型p53を有する癌が、最も予後が悪いという報告がある（キャンサーリサーチ、55巻、5217-5221、1995年）。

ELOVL2 (Genbank Accession No. XM\_166355) は、*S. cerevisiae* のELO (elongation of very long chain fatty acids protein) ファミリーに相同性を持ち、長鎖脂肪酸伸長反応に関与する酵素であるELOVLファミリー (ELOVL1-5) に属す

る。ELOVLファミリーは、炭素数20以上の長鎖（不飽和）脂肪酸またはスフィンゴ脂質の合成に必要な酵素である。

5      Staufen homolog 2 (STAU2) (ゲノミクス、62巻、113-118頁、1999年)は、RNA binding protein であるDrosophila Staufenのヒトホモログの一つである。ラットでは海馬神経細胞の樹状突起でのmRNAの運搬に関与することが報告されている (モレキュラー バイオロジー オブ ザ セル、9巻、2945-2953頁、1999年) 。STAU2は、PKR (double-stranded RNA-activated protein kinase) 、TAR RNA binding protein (TRBP) などと共にRNA binding protein ファミリーに属する。TRBPの過剰発現細胞は、transformed phenotypeを示すことが報告されている (ザ エンボジャーナル、16巻、611-624、1997年) ものの、STAU2と癌との関連についての報告はない。

癌細胞に特異的に発現する分子を標的とし、癌細胞の増殖阻害、またはアポトーシス誘導を行える薬剤が切望されている。

## 15      発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、癌組織に発現が顕著に増加する遺伝子（変異型p53誘導遺伝子として見出したELOVL2遺伝子およびSTAU2遺伝子）を見出し、さらに、該遺伝子の機能を抑制することにより、アポトーシスが誘導されることを見出した。この知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1)      配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、
- 25      (2)      配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、
- (3)      配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌク

レオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、

(4) 配列番号：10で表される塩基配列を有する上記(3)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、

5 (5) 上記(3)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(6) 癌の予防・治療剤である上記(5)記載の医薬、

(7) 上記(3)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(8) 癌の診断薬である上記(7)記載の診断薬、

10 (9) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(10) 上記(9)記載の抗体を含有してなる医薬、

(11) 癌の予防・治療剤である上記(10)記載の医薬、

15 (12) 上記(9)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(13) 癌の診断薬である上記(12)記載の診断薬、

(14) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌の診断薬、

20 (15) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である上記(1)、(2)、(6)または(11)記載の予防・治療剤、

(15a) 癌が、乳癌または前立腺癌である上記(1)、(2)、(6)または(11)記載の予防・治療剤、

(16) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である上記(8)、(13)または(14)記載の診断薬、

(16a) 癌が、乳癌または前立腺癌である上記(8)、(13)または(1



## 4) 記載の診断薬、

(17) ELOVL2の活性を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(17a) ELOVL2の活性を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

(18) ELOVL2の発現を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(18a) ELOVL2の発現を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

10 (19) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

(19a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

15 (19b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(19a)記載のスクリーニング方法、

20 (20) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

(20a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

25 (20b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(20a)記載のスクリーニング用キット、

(21) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

(21a) 上記(19a)記載のスクリーニング方法または上記(20a)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる医薬用化合物またはその塩、

(21b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(

5 21a)記載の化合物またはその塩、

(21c) 上記(21b)記載の化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(21d) 癌が乳癌または前立腺癌である上記(21c)記載の予防・治療剤

、

10 (21e) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる乳癌または前立腺癌の予防・治療剤

、

(22) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌ

15 クレオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

(22a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

(22b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(

20 22a)記載のスクリーニング方法、

(23) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キ

25 ャット、

(23a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

(23b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(23a)記載のスクリーニング用キット、

5 (24) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

(24a) 上記(22a)記載のスクリーニング方法または上記(23a)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる医薬用化合物またはその塩、

10 (24b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(24a)記載の化合物またはその塩、

(24c) 上記(24b)記載の化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(24d) 癌が乳癌または前立腺癌である上記(24c)記載の予防・治療剤、

15 (24e) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる乳癌または前立腺癌の予防・治療剤、

20 (25) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

(26) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

25 (27) 上記(3)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス促進剤、

(28) 上記(9)記載の抗体を含有してなるアポトーシス促進剤、

(29) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

(29a) 医薬用化合物が、アポトーシス促進作用を有する化合物である上記  
(19a) 記載のスクリーニング方法、

(30) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の  
アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌ  
クレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法  
5

(30a) 医薬用化合物が、アポトーシス促進作用を有する化合物である上記  
(22a) 記載のスクリーニング方法、

(31) 哺乳動物に対して、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もし  
10 くは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチ  
ドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺  
伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする  
癌の予防・治療方法、

(32) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の  
15 アミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活  
性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする  
癌の予防・治療方法、

(33) 癌の予防・治療剤を製造するための、配列番号：1で表されるアミノ  
酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もし  
20 くはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または  
該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用、

(34) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一  
のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の  
活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

25 (35) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一  
のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を  
阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(36) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一  
のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリ

ヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、

(37) 配列番号：25で表される塩基配列を有する上記(36)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、

5 (38) 上記(36)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(39) 癌の予防・治療剤である上記(38)記載の医薬、

(40) 上記(36)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

10 (41) 癌の診断薬である上記(40)記載の診断薬、

(42) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(43) 上記(42)記載の抗体を含有してなる医薬、

15 (44) 癌の予防・治療剤である上記(43)記載の医薬、

(45) 上記(42)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(46) 癌の診断薬である上記(45)記載の診断薬、

(47) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリ  
20 ヌクレオチドを含有してなる癌の診断薬、

(48) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である上記(34)、(35)、(39)または(44)記載の予防・治療剤、

25 (49) 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である上記(41)、(46)または(47)記載の診断薬、

(50) Staufen homolog 2の活性を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(5 1) Staufen homolog 2の発現を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

5 (5 2) 配列番号：1 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

(5 2 a) 配列番号：1 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

10 (5 2 b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(5 2 a)記載のスクリーニング方法、

(5 3) 配列番号：1 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

15 (5 3 a) 配列番号：1 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

(5 3 b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(5 3 a)記載のスクリーニング用キット、

(5 4) 上記(5 2)記載のスクリーニング方法または上記(5 3)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

(5 4 a) 上記(5 2 a)記載のスクリーニング方法または上記(5 3 a)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる医薬用化合物またはその塩、

25 (5 4 b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記(5 4 a)記載の化合物またはその塩、

(5 4 c) 上記(5 4 b)記載の化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤、

(55) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、

5 (55a) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

(55b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記（

10 55a) 記載のスクリーニング方法、

(56) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

15 (56a) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

(56b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記（  
20 56a) 記載のスクリーニング用キット、

(57) 上記（55）記載のスクリーニング方法または上記（56）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤、

(57a) 上記（55a）記載のスクリーニング方法または上記（56a）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる医薬用化合物またはその塩、  
25

(57b) 医薬用化合物が、癌の予防・治療用の化合物、癌の予防・治療に用いられる化合物および／または癌の予防・治療効果を有する化合物である上記（  
57a) 記載の化合物またはその塩、

(57c) 上記（57b）記載の化合物またはその塩を含有してなる癌の予防

・治療剤、

(58) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

5 (59) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤、

(60) 上記(36)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス促進剤、

10 (61) 上記(42)記載の抗体を含有してなるアポトーシス促進剤、

(62) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

(63) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一  
15 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

(64) 哺乳動物に対して、配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペ  
20 チドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、

(65) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一  
25 のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、

(66) 癌の予防・治療剤を製造するための、配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、また



は該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用などを提供する。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 5      本発明で用いられる配列番号：1または配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、
- 10    グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、
- 15    またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前
- 20    立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であつてもよく、合成タンパク質であつてもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

25

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィ

ルタリング=OFF)にて計算することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を

5 含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、脂肪酸延長活性、細胞増殖促進活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、脂肪酸延長活性、細胞増殖促進活性などが同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～

10 10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

脂肪酸延長活性の測定は、自体公知の方法、例えばザ ジャーナル オブ セル バイオロジー、707-717頁、2000年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。具体的には、(a) 本発明のタンパク質（例、ELOVL2

15 ）の発現ベクターを導入した細胞の抽出液、(b) 基質脂肪酸、および(c) 標識されたマロニルCoAを適当な緩衝液中で反応させ、この反応液から標識された脂肪酸を抽出し、その標識量を測定することにより、本発明のタンパク質（例、ELOVL2）の脂肪酸延長活性の程度を測定できる。

細胞増殖促進活性の測定は、自体公知の方法、例えばコロニーフォーメーションアッセイ法またはそれに準じる方法などに従って測定することができる。具体的には、本発明のタンパク質（例、ELOVL2）の発現ベクターが導入された細胞を培養（例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養）し、形成されたコロニーを染色した後、その面積を測定することにより、本発明のタンパク質（例、ELOVL2）の細胞増殖促進活性の程度を測定できる。

25 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; マトリクス=BLOSUM62 ; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。

- 5 配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。
- 10 実質的に同質の活性としては、例えば、細胞増殖促進活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に (例、生理学的に、または薬理学的に) 同質であることを示す。したがって、細胞増殖促進活性が同等 (例、約 0.01 ~ 100 倍、好ましくは約 0.1 ~ 10 倍、より好ましくは 0.5 ~ 2 倍) であることが好ましいが、この活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素
- 15 は異なってもよい。

細胞増殖促進活性の測定は、自体公知の方法、例えばコロニーフォーメーションアッセイ法またはそれに準じる方法などに従って測定することができる。具体的には、本発明のタンパク質 (例、STAU2) の発現ベクターが導入された細胞を培養 (例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養) し、形成されたコロニーを染色した後、その面積を測定することにより、本発明のタンパク質 (例、STAU2) の細胞増殖促進活性の程度を測定できる。

20

- また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(1) 配列番号 : 1 または配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに
- 25 好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号 : 1 または配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例えば 1 ~ 100 個程度、好ましくは 1 ~ 30 個程度、好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数 (1 ~ 5) 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 配列番号 : 1 または配列番号 : 16 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例

例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号:1または配列番号:16で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

- 10 本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1または配列番号:16で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基( $-\text{COOH}$ )、カルボキシレート( $-\text{COO}^-$ )、アミド( $-\text{CONH}_2$ )またはエステル( $-\text{COOR}$ )の何れであってもよい。

- 15 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラールキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 20 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内

のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）

を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂

、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十

分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C<sub>1-6</sub>）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2



5 , 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用い

10 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理

15 20 によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

25 タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶

媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(1)～(5)に記載された方法が挙げられる。

(1) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(2) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(4) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(5) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチド

が遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述  
5 した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

10 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

15 本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(2) 配列番号：  
20 17で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：17で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

25 配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：17で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：17で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

10 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

15 ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

20 より具体的には、(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNAなどが、(2) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

25 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例、DNA) としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組

織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：2 または配列番号：17 で表される塩基配列を含有する DNA の一部分を含有する DNA、または配列番号：2 または配列番号：17 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の一部分を含有する DNA などが用いられる。

配列番号：2 または配列番号：17 で表される塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードする DNA のクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成 DNA プライマーを用いて PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNA の塩基配列の置換は、PCR、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードする DNA は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該 DNA はその 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、ま

た3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることがで

きる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*dhfr*と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、*Amp<sup>r</sup>*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neo<sup>r</sup>*と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。

- 5 特に、*dhfr* 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて *dhfr* 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

- 15 このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , JA221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C600 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

- 25 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-

1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC  
1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM 7  
1 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、ヨトウガの幼虫  
5 由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell ; S f 細胞)、Trichoplusia ni の  
中腸由来の MG 1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five™ 細胞、Mamestra  
brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウ  
イルスが B m N P V の場合は、カイコ由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞 ; B m  
N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC C  
10 RL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、In Vivo, 13, 213-217, (1977)  
) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, 315  
巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, V e r o, チャイニーズハ  
ムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニ  
ーズhamster細胞 CHO (以下、CHO (d h f r-) 細胞と略記), マウス  
L 細胞, マウス A t T-2 0, マウスミエローマ細胞, マウス A T D C 5 細胞,  
15 ラット GH 3, ヒト FL 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
20 , 69巻, 2110(1972)、Gene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうこと  
ができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 1  
68巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(19  
25 91)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って  
行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(  
1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロ



トコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 5 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン
- 10 、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミ
- 15 ノ酸を含むM9培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間
- 20 行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 25

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Gr

ace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature), 195, 788(1962)) に非動化した 10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2~6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃ で約 3~5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 5 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5~20%の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122 巻, 501(1952)], DME M 培地 [Virology, 8 巻, 396(1959)], RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association 199 巻, 519(1967)], 199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 巻, 1(1950)] などが用いられる。pH は約 6~8 であるのが好ましい。培養は通常約 30~40℃ で約 15~60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

- 15 上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 20 本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100™ などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 25 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーな

どの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 5    かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 10    なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどにより測定することができる。

- 15    本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

- 20    本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 25    本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウ

ス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

5 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することが  
10 できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/O、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用  
15 いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用  
20 できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗  
25 体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)

を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

10 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体の  
15 みを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質  
20 に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合  
25 比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

10 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

15 本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

25 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も

好ましくは約 95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、(ロ) RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2または配列番号：17で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2または配列番号：17で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2または配列番号：17で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）が挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2または配列番号：17で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRN

Aとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パ

5

10

15

リンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、

20

2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質、核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で

25



- 知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、
- 5   メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 10   本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計
- 15   されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

5 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAse などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

20 アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

25 以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）

の用途を説明する。

また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドを、本発明のタンパク質Aと、配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

5 アミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドを、本発明のタンパク質Bと略記することもある。

本発明のタンパク質は、癌組織で発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することができる。すなわち、癌組織における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

- 10 また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、癌細胞に対して、細胞死を促進する優れたアポトーシス促進作用を有する。

よって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明の抗体を含有する医薬は、例えば、大腸

15 癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして使用することができる。

また、本発明のタンパク質の遺伝子は、正常組織での発現が低いことから、副作用の少ない癌の予防・治療剤のスクリーニングが可能になる。また、変異型 p

20 53を保持している癌は、臨床で抗癌剤が効きにくい、予後が悪い等、悪性度が高いことが知られている。本発明のタンパク質遺伝子は、変異型 p 53の下流で働くことより、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、また

25 は本発明のタンパク質に対する抗体などは、悪性度の高い癌にも効果的である。

#### (1) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は癌組織で発現が増加しており、さらに、本発明のタンパク質の活性を阻害すると癌細胞がアポトーシスを起こす。従って、本発明のタン

パク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤

5 である。また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、アポトーシス促進剤として使用することもできる。

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、本発明のタンパク質Aを用いることを特徴とする本発明のタンパク

10 質Aの活性（例えば、脂肪酸延長活性、細胞増殖促進活性など）を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、例えば、(ia) 本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞の脂肪酸延長活性または細胞増殖促進活性と、(iia) 本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の脂肪酸延長活性または細胞

15 増殖促進活性とを比較することを特徴する本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

上記スクリーニング方法においては、例えば (ia) と (iia) の場合において、脂肪酸延長活性を自体公知の方法、例えばザ ジャーナル オブ セル バイオロジー、707-717頁、2000年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定し

20 、比較する。

具体的には、(ia) (1) 本発明のタンパク質A（例、ELOVL2）の発現ベクターを導入した細胞の抽出液、(2) 基質脂肪酸、および(3) 標識されたマロニルCoAを適当な緩衝液中で反応させ、この反応液から標識された脂肪酸を抽出した場合と、(iia) (1) 本発明のタンパク質A（例、ELOVL2）の発現ベクターを導入した細胞の抽出液、(2) 基質脂肪酸、(3) 標識されたマロニルCoA、(4) 試験化合物を適当な緩衝液中で反応させ、この反応液から標識された脂肪酸を抽出した場合との、遊離脂肪酸の標識量を測定し、比較する。

25

基質脂肪酸としては、例えば、不飽和脂肪酸（例、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサテトラエン酸、アラキドン酸、アラキドニル-コエ

ンザイムA、ドコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸、メアド酸、エイコサテ  
トラエン酸、エイコサトリエン酸、ジホモ-ガンマ-リノレン酸、テトラコサテト  
ラエン酸、テトラコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、オクタデセン酸、エ  
イコセン酸、ドコセン酸、テトラコセン酸、オクタデカジエン酸、エイコサジエ  
5   ン酸など）が用いられる。好ましくは炭素数18～24（好ましくは炭素数20  
または22）の不飽和脂肪酸などが用いられる。さらに好ましくは、cis-5, 8, 11  
, 14, 17-eicosapentaenoic acid (EPA)、cis-7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic  
acid (DPA)、cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid (Arachidonic acid)、Ar  
achinonyl-CoA、cis-7, 10, 13, 16-docosatetraenoic acid、cis-5, 8, 11-eicosatr  
10   ienoic acidなどが用いられる。

標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ など）、蛍光  
物質〔例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバ  
イオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシア  
ネートなど〕などが用いられる。

15   標識量の測定は、公知の方法で行えばよい。

上記スクリーニング方法の具体例を以下に示す。

基質脂肪酸を含む脂肪酸延長活性反応液〔50mM リン酸化カリウム/水酸化ナト  
リウム（pH6.5）、5 $\mu\text{M}$  ロテノン（和光純薬）、100 $\mu\text{M}$  CoA（和光純薬）、1mM A  
TP、1mM NADPH、1mM 塩化マグネシウム〕を調整し、この反応液を96ウェルプレ  
20   ートに分注し、37°Cで1分間インキュベートする。その後、試験化合物および本  
発明のタンパク質A（例、ELOVL2）を高発現する動物細胞（例、CHO細胞）株由  
来の細胞抽出液を酵素源として添加、攪拌後、37°Cで60分間インキュベートする  
。その後、トリクロロ酢酸を4%となるように添加、さらに1 $\mu\text{L}$  185kBq [ $2\text{-}^{14}\text{C}$   
]-マロニルCoA（Amercham BioScience社）を添加して攪拌する。この反応生成物  
25   をHarvexter（Packard）を用いてUnifilter-96 GF/C（Packard）で回収する。mi  
croscinti-20（ParkinElmer）20 $\mu\text{L}$ 添加、攪拌後、TopCount（Packard）により  
、標識された（遊離）脂肪酸の放射活性（例、 $^{14}\text{C}$ ）を測定する。試験化合物を  
添加しない場合の活性を100とし、50%阻害濃度（ $\text{IC}_{50}$ 値）を求め、より低い $\text{IC}_{50}$   
値を与える化合物を、本発明のタンパク質A（例、ELOVL2）の活性（例、脂肪酸

延長活性)を阻害する化合物として選択する。

上記スクリーニング方法においては、例えば (ia) と (iia) の場合において、細胞増殖促進活性を自体公知の方法、例えばコロニーフォーメーションアッセイ法またはそれに準じる方法などに従って測定し、比較する。

- 5      具体的には、(ia) 本発明のタンパク質Aの発現ベクターが導入された細胞を培養（例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養）し、形成されたコロニーを染色した場合と、(iia) 本発明のタンパク質Aの発現ベクターが導入された細胞および試験化合物を培養（例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養）し、形成されたコロニーを染色した場合との、その面積を測定し、  
10      比較する。

- 本発明のタンパク質Aを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質AをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS 7細胞、CHO細胞、HEK 293細胞、MCF-7細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本  
15      発明のタンパク質Aを細胞内に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質Aを発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

- 試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。  
20

- 例えば、上記 (iia) の場合における脂肪酸延長活性または細胞増殖促進活性を、上記 (ia) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質Aの活性を  
25      阻害する化合物として選択することができる。

本発明のタンパク質Aの活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合

成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

5 本発明は、本発明のタンパク質Bを用いることを特徴とする本発明のタンパク質Bの活性（例えば、細胞増殖促進活性など）を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法も提供する。

より具体的には、例えば、(ib) 本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞の細胞増殖促進活性と、(iib) 本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の細胞増殖促進活性との比較することを特徴する本発明のタンパク質Bの活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

上記スクリーニング方法においては、例えば (ib) と (iib) の場合において、細胞増殖促進活性を自体公知の方法、例えばコロニーフォーメーションアッセイ法またはそれに準じる方法などに従って測定し、比較する。

15 具体的には、(ib) 本発明のタンパク質Bの発現ベクターが導入された細胞を培養（例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養）し、形成されたコロニーを染色した場合と、(iib) 本発明のタンパク質Bの発現ベクターが導入された細胞および試験化合物を培養（例、導入された細胞のみを選択するような培地で培養）し、形成されたコロニーを染色した場合との、その面積を測定し、比較する。

20 本発明のタンパク質Bを産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質BをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質Bを細胞膜上、細胞内に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質Bを発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合

成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

例えば、上記 (iib) の場合における細胞増殖促進活性を、上記 (ib) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上  
5 阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質 B の活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のタンパク質 B の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる  
10 化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質の遺伝子も、癌組織において発現が増加するので  
15 、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩も、例えば乳癌、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤である。また、本発明のタンパク質をコードする  
20 遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、アポトーシス促進剤として使用することもできる。

したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

25 スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（



具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量)を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

- 5      タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 10      mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2またはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 15      例えば、上記(iv)の場合における遺伝子の発現を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

- 20      本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性(例、脂肪酸延長活性、細胞増殖促進活性など)を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタ

ンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤）として、またはアポトーシス促進剤などの、副作用が極めて少ない医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤

に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それ  
5 ぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

- 10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1～100mg、好ましくは約 1.0～50mg、より好ましくは約 1.0～20mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の 1 回投与量は投与  
20 対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重 60kg として）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約 0.01～30mg 程度、好ましくは約 0.1～20mg 程度、より好ましくは約 0.1～10mg 程度を癌病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物  
25 の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

また、上記化合物は、既存の抗癌剤と組み合わせて用いることができ、抗癌剤の正常細胞に障害を及ぼす副作用が軽減される。この際、投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。投与量は、臨床上用いられている用量を基準として適宜選択することが

できる。また、上記化合物と抗癌剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせ等に応じて適宜選択することができる。

既存の抗癌剤としては、例えば、化学療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤などが挙げられる。

- 5 化学療法剤としては、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イ  
フォスファミド、ニムスチン、ラニムスチン、カルボコン等）、代謝拮抗剤（例  
、メソトレキセート、5-フルオロウラシル、テガフル、カルモフル、UFT  
、ドキシフルリジン、シタラビン、エノシタビン、メルカプトプリン、メルカプ  
トプリンリボシド、チオグアニン等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、  
10 アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ピラルビシン、イダルビシ  
ン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、アクチノマイシン等）、植物由来抗癌剤  
（例、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エトポシド、カンプトテ  
シン、イリノテカン等）、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、パク  
リタキセル、ドセタキセル、エストラムスチン等が挙げられる。
- 15 ホルモン療法剤としては、例えば副腎皮質ホルモン薬（例、プレドニゾロン、  
プレドニゾン、デキサメタゾン、酢酸コルチゾン等）、エストロゲン薬（例、エ  
ストラジオール、エチニルエストラジオール、ホスフェストロール、クロロトリ  
アニセン等）、抗エストロゲン薬（例、エピチオスタノール、メピチオスタン、  
タモキシフェン、クロミフェン等）、黄体ホルモン薬（例、カプロン酸ヒドロキ  
20 シプロゲステロン、ジドロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、ノルエチス  
テロン、ノルエチンドロン等）、LHRH誘導体（例、酢酸リユープロレリン等）等  
が挙げられる。

- 免疫療法剤としては、例えば微生物又は細菌成分（例、ムラミルジペプチド誘  
導体、ピシバニール等）、免疫増強活性のある多糖類（例、レンチナン、シゾフ  
25 イラン、クレスチン等）、遺伝子工学的手法で得られるサイトカイン（例、イン  
ターフェロン、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン12（IL-12）、  
腫瘍壊死因子（TNF）等）、コロニー刺激因子（例、顆粒球コロニー刺激因子、  
エリスロポエチン等）等が挙げられる。

更に、動物モデルや臨床で悪液質改善作用が認められている薬剤、即ち、シク

ロオキシゲナーゼ阻害剤（例、インドメタシン等）〔Cancer Research、第49巻、5935～5939頁、1989年〕、プロゲステロン誘導体（例、メゲステロールアセテート）〔Journal of Clinical Oncology、第12巻、213～225頁、1994年〕、糖質ステロイド（例、デキサメサゾン等）、メトクロプラミド系薬剤、テトラヒドロカンナビノール系薬剤（文献は何れも上記と同様）、脂肪代謝改善剤（例、エイコサペンタエン酸等）〔British Journal of Cancer、第68巻、314～318頁、1993年〕、成長ホルモン、IGF-1、あるいは悪液質を誘導する因子であるTNF- $\alpha$ 、LIF、IL-6、オンコスタチンMに対する抗体等も上記化合物と併用することができる。

10

（2）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

15

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

20 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

25 上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗

体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$  などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。

もよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 5 本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。
- 10

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。
- 15
- 20

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。
- 25

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌(好ましくは、乳癌、前立腺癌など)である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用



することができる。

### (3) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは  
5 温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多  
10 などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of  
15 the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異などが検出された場合は、例えば大  
20 腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌（好ましくは、乳癌、前立腺癌など）である可能性が高いと診断することができる。

### 25 (4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能（例、脂肪酸延長活性、細胞増殖促進活性など）を抑制することができるので、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、

食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤である。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは癌細胞のアポトーシスを促進するため、例えば、アポトーシス促進剤として使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤、促進剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することが

でき、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられる DNA の機能を抑制することができるので、例えば、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（  
5 好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤）、アポトーシス促進剤などとして使用することができる。

二重鎖 RNA は、公知の方法（例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221 頁  
10 , 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードする RNA の一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードする RNA の一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明の RNA 上の切断部位に近接した部分（RNA 断片）が挙げられる。

15 上記の二重鎖 RNA またはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

#### （5）本発明の抗体を含有する医薬

20 本発明の抗体は、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（例、ワクチンなど）として使用することができる。好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤である。また、本発明の抗体は、例えば、アポトーシス促進剤として使用することもで  
25 きる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤、促進剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与することができ

る。好ましくはワクチンとして定法に従って投与することができる。

本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体およびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形

としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常5～500mg程度、とりわけ注射剤では5～100mg程度、その他の剤形では10～250mg程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

- 5 本発明の抗体を含有する上記予防・治療剤、調節剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の乳癌の予防・治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは
- 10 1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許
- 15 容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

- 20 (6a) 本発明の「ELOVL2の活性阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤」および「ELOVL2の発現阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤」について

- 「ELOVL2の活性阻害作用を有する化合物」は、ELOVL2の活性阻害作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、
- 25 前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤）、アポトーシス促進剤などとして用いられる。

「ELOVL 2 の発現阻害作用を有する化合物」は、ELOVL 2 の発現阻害作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤）、アポトーシス促進剤などとして用いられる。

該予防・治療剤、促進剤は、上記と同様にして製造される。

(6 b) 本発明の「Staufen homolog 2 の活性阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤」および「Staufen homolog 2 の発現阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤」について

「Staufen homolog 2 の活性阻害作用を有する化合物」は、Staufen homolog 2 の活性阻害作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして用いられる。

「Staufen homolog 2 の発現阻害作用を有する化合物」は、Staufen homolog 2 の発現阻害作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤、アポトーシス促進剤として用いられる。

該予防・治療剤、促進剤は、上記と同様にして製造される。

#### (7) DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、  
(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および  
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において  
発現しうる組換えベクターを提供するものである。

- 5 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、  
本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始  
原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生におけ  
る胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般  
に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法  
10 、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキ  
ストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することが  
できる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに  
目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用する  
こともでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法によ  
15 り融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ  
、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも  
、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、  
また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57  
20 BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>  
系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（  
例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、  
上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

- 25 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA  
ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば  
、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への  
置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

5 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

15 本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

20 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(1)ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(2)各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリン  
25 I I、ウロプラキン I I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK 1, K 1 0およびK 1 4、コラーゲン I 型および I I 型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  I サブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナト



リウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にT i e 2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（N a , K - A T P a s e）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびI I A、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H - 2 L）、H - r a s、  
5 レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（T P O）、ペプチド鎖延長因子1α（E F - 1 α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、T h y - 1、免疫グロブリン、H鎖可変部（V N P）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、  
10 バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1α（E F - 1 α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNA  
15 Aの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプ  
20 ライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、  
25 ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変

異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

- 5 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は
- 10 その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

- 15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する
- 20 。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

- 25 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタ

ンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

(1) 組織培養のための細胞源としての使用、

(2) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

(3) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(4) 上記(3)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(5) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性

型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

- すなわち、本発明は、
- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
  - (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、
  - (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、
  - (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、
  - (5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、
  - (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
  - (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
  - (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
  - (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
  - (10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性

を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 5 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエクソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。
- 10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）
- 15 ）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、
- 20 例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を
- 25 選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのE

S細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発

生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、S T O 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でL I F (1~10000U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、

5 、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

- 10 E S 細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のE S 細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。
- 15

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。
- 20

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。
- 25

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近



傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲットイングベクター上のDNA配列と、ターゲットイングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 10    該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、
- 15    本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲットイングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。
- 20    このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 25    さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の

雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- 5     また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。
- 10    (8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニング方法
- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防・治療効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。
- 15    すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して予防・治療効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。
- 20    試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。
- 25    具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の予防・治療効果を試験することができる。
- 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して予防・治療効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウ

シ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

15 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

25 レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支

配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (l a c Z) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-g a l) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (P B S) で洗浄後、X-g a lを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM E D T A / P B S 溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、l a c ZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、

脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 5     該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 10    このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 15    該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 20    このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

- 25    また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる

。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

5

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

10

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
15 G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
20 dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
25 SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン

	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
5	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
10	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
15	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

20 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
25	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル



	Bz1	: ベンジル
	Cl <sub>2</sub> -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
5	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Trt	: トリチル
10	Bum	: t-ブトキシメチル
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
15	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

20 ELOVL2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するELOVL2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

25 ELOVL2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：8〕

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

10 実施例4で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

実施例4で用いられたコントロールオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

実施例4および5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：13〕

実施例4および5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

20 実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

STA U2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

配列番号：16で表されるアミノ酸配列を有するSTA U2をコードするDNA

25 Aの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

STA U2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例12で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：22〕

実施例12で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

10 実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例13で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

実施例13で用いられたコントロールオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

15

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

## 20 実施例

### 実施例1

#### （1）変異型p53ベクターの構築

25 野生型p53の翻訳開始コドンATGのAから数えて524番目の塩基をGからAに置換したフォワード側およびリバーズ側のプライマー（配列番号：4および配列番号：5）を作製した。野生型p53（WTp53）（Genbank Accession No. AF136270）をpcDNA3.1ベクター（Invitrogen）のBam HI、Eco RIサイトに組み込み、pcDNA3.1-WTp53ベクターを得た。このpcDNA3.1-WTp53ベクターを鋳型として、上記2種類のプライマーを使用し、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGEN

E)を用いて変異型p53 (MTp53) 遺伝子を作製した。方法は添付プロトコールに従った。これをBam HI とEco RIで制限酵素処理し、同酵素で処理したpIND vector (Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System (invitrogen)に添付)に組み込み、pIND-MTp53 vectorを得た。この変異型p53は、175番目のアミノ酸配列が、アルギニン (R) からヒスチジン(H)に置換している。コントロールとして野生型p53遺伝子をpIND vectorに組み込んだpIND-WTp53 vectorも調製した。もう一つのコントロールとしてCAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) が組み込まれたpIND-CAT vector (invitrogen)も使用した。

## 10 (2) 変異型p53遺伝子発現制御細胞の構築

p53が欠失している肺がん由来細胞株H1299 (ATCC) を6cmシャーレに $4 \times 10^5$ 個播種し、一晚培養後、Fugene6を用いて、添付プロトコールに従い、上記(1)で得られたpIND-MTp53 vector、pIND-WTp53 vector、pIND-CAT vectorを、pVgRXR vector [Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System (Invitrogen) に添付] とco-transfectionした。ジェネティシン (GIBCO BRL) とZeosin (Invitrogen) により、それぞれの遺伝子の導入細胞株H1299-MTp53、H1299-WTp53、およびH1299-CATを選択した。これらH1299-MTp53、H1299-WTp53の安定発現株は、5 $\mu$ MのMuristerone A (Invitrogen) 添加で、それぞれ、MTp53および WTp53の発現が誘導されることを、抗p53抗体 (Oncogene) を用いてウェスタンブロッティング法で確認した。

## (3) GeneChip解析

変異型p53によって発現誘導される遺伝子群を明らかにするため、5 $\mu$ M Muristerone Aを添加後、48時間後のH1299-MTp53、H1299-WTp53、H1299-CATから調製したtotal RNAを材料とし、GeneChip (Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社) を用いて遺伝子発現解析を行った。また、23種類の正常組織から抽出されたtotal RNA (表1) を材料とし、同様に遺伝子発現解析を行った。実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical manual) に従った。

その結果、変異型p53の発現を誘導したH1299細胞（H1299-Mtp53（48hr））において、野生型p53の発現を誘導したH1299細胞およびCATの発現を誘導したH1299細胞〔H1299-Wtp53（48hr）および H1299-CAT（48hr）〕に比較し、発現が増加している遺伝子としてELOVL2遺伝子を見出した。この遺伝子は脳、精巣以外の正常組織では、その発現量が検出限界以下であった（表2）。

表 1

RNAを抽出した組織	販売元
小腸	Clontech社
10 前立腺	Clontech社
脂肪	BioChain Institute社
骨格筋	Clontech社
心臓	Clontech社
腎臓	Clontech社
15 副腎	Clontech社
肝臓	Clontech社
膵臓	Clontech社
脾臓	Clontech社
気管	Clontech社
20 肺	Clontech社
全脳	Clontech社
小脳	Clontech社
胸腺	Clontech社
乳腺	Clontech社
25 唾液腺	Clontech社
胃	Clontech社
直腸	BioChain Institute社
大腸	BioChain Institute社
子宮	Clontech社

子宮頸

BioChain Institute社

精巢

Clontech社

表 2

5	組織	遺伝子発現量 <sup>a</sup>
	小腸	ND
	前立腺	ND
	脂肪	ND
	骨格筋	ND
10	心臓	ND
	腎臓	ND
	副腎	ND
	肝臓	ND
	膵臓	ND
15	脾臓	ND
	気管	ND
	肺	ND
	全脳	1.5
	小脳	2.5
20	胸腺	ND
	乳腺	ND
	唾液腺	ND
	胃	ND
	直腸	ND
25	大腸	ND
	子宮	ND
	子宮頸	ND
	精巢	6.6
	H1299-Mtp53 (48hr)	2.6

H1299-Wtp53 (48hr) 0.9

H1299-CAT (48hr) 0.8

---

\*遺伝子発現量は、Genechipで発現が検出された全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

5 ND; not detected

## 実施例 2

ヒト大腸がん、乳がんおよび肺がん組織におけるELOVL2遺伝子発現量の検討

ヒト大腸がん、乳がんおよび肺がん組織由来のcDNA (Biochain社) および健康  
10 人大腸、乳腺および肺組織由来first- strand cDNA (Clontech社) を鋳型として  
用い、ELOVL2遺伝子発現量の検討を行った。なお、これらのサンプルは事前に  
β-アクチン遺伝子発現量で補正した。2種類のプライマー (配列番号: 6 および  
配列番号: 7) を用いてPCR反応を行うことにより、がん組織と正常組織でのELO  
VL2遺伝子の発現量比較を行った。その結果、ELOVL2遺伝子はヒト大腸がん、乳が  
15 んおよび肺がん組織でそれぞれの正常組織に比較し、顕著に発現が亢進している  
患者が認められた。

## 実施例 3

### (1) 動物細胞発現ベクターの構築

20 Genbank NM\_017770に記載されているELOVL2遺伝子の配列を基にして2種類の  
プライマー (配列番号: 8 および配列番号: 9) を作成し、pyrobest DNA polym  
erase (宝酒造) を用いて5 μM Muristerone Aを添加したH1299-MTp53 から調製  
したcDNAを鋳型としてPCRを行いDNA断片を得た。この遺伝子断片およびpCDNA3.1  
(+) plasmid (Invitrogen) を、制限酵素EcoRVおよびNotIで切断し、TaKaRa Liga  
25 tion Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて結合させ、得られたプラスミドDNAを公知の方  
法により大腸菌DH5αに導入し、形質転換体 (クローン) を得た。この形質転換  
体からプラスミドを抽出しシークエンサー (Applied Biosystem社: ABI3100) を  
用いてインサート部分の塩基配列を確認し、動物細胞発現ベクターpCDNA3.1(+)-  
ELOVL2を構築した。

## (2) ELOVL2遺伝子による細胞増殖効果

6ウェルプレートに、ヒト乳がん細胞株MCF7 (ATCC)、ヒト肺がん細胞株H1299 (ATCC)を $1.1 \times 10^5$ 個ずつ播種し、一晚培養後、FuGene6 (Roche)を用いて添付のプロトコールに従い、上記で得られたpCDNA3.1(+)-ELOVL2およびpCDNA3.1(+)-LacZ (Invitrogen)を導入した。一晚培養後、ジェネティシン (Invitrogen)を培地に加えて6日間培養した。その後、細胞を6cmシャーレに播種しなおして、さらにジェネティシンを添加した培地で3週間細胞を培養した。PBSで洗浄後、10%中性フオルマリン溶液 (和光純薬) にて室温で30分間固定し、PBSで洗浄した。その後

5 10 に、クリスタルバイオレット (SIGMA) 溶液 (クリスタルバイオレットが10%になるようエタノールで溶解し、それをPBSで100倍に希釈したもの) で細胞を室温で2時間染色し、蒸留水にて洗浄し風乾させた。染色された細胞の面積をImagProアプリケーション(Media Cybernetics社)で測定した。

その結果、MCF7細胞にpCDNA3.1(+)-LacZを導入した群の面積を100%とすると

15 、pCDNA3.1(+)-ELOVL2を導入した群の面積は170% ( $P < 0.01$ ) であった。H1299細胞にpCDNA3.1(+)-LacZを導入した群の面積を100%とすると、pCDNA3.1(+)-ELOVL2を導入した群の面積は130% ( $P < 0.01$ ) であった。

## 実施例 4

### 20 アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞死

ELOVL2遺伝子のアポトーシスに及ぼす影響を解析するために、ELOVL2アンチセンスオリゴヌクレオチド導入実験を行った。

まず、配列番号：3で表される塩基配列に対するアンチセンス (配列番号：10) を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製

25 して導入実験に用いた (Amersham Pharmacia Biotech)。コントロールオリゴヌクレオチドとしては配列番号：10で示される塩基配列のリバーズ配列 (配列番号：11) を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた (Amersham Pharmacia Biotech)。

被験細胞として乳がん細胞株MCF7 (大日本製薬) を用い、オリゴヌクレオチド



導入前日に $1.5 \times 10^4$ 個の細胞を24ウェルプレート (Falcon社) に播種した。オリゴヌクレオチド導入にはOligofectAMINE (Invitrogen社) を使用し、そのプロトコールに従った。導入後20時間でRNeasy mini kit (Qiagen社) のプロトコールに従ってRNAを抽出し、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem社) を用いてcDNAを調製した。2種のプライマー (配列番号: 12 および配列番号: 13) を用いてELOVL2遺伝子の発現量を、また補正のためにTaqMan human  $\beta$ -actin control reagent (Applied Biosystem社) を用いて $\beta$ アクチン発現量を見ることとし、ABI7700 (Applied Biosystem社) マニュアルに従いPCRを行った。ELOVL2遺伝子の発現量を測定する際の該反応における反応液の組成は、SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystem社) を $7.5 \mu\text{l}$ 、上記で調製したcDNAテンプレートを滅菌蒸留水で3倍に希釈したものを $5 \mu\text{l}$ 、2種のプライマー (配列番号: 12 および配列番号: 13) を各 $0.5 \mu\text{M}$ となるように加え、 $15 \mu\text{l}$ の液量とした。PCR反応は、 $50^\circ\text{C}$ 2分、 $95^\circ\text{C}$ 10分の後、 $95^\circ\text{C}$ 15秒、 $60^\circ\text{C}$ 1分のサイクルを40回繰り返した。ELOVL2遺伝子の発現量は $\beta$ アクチン発現量で補正して比較した。

一方、アポトーシスに及ぼす影響はアンチセンスオリゴヌクレオチド導入後3日目にCell death detection ELISA (Roche社) を用いてコントロールオリゴ導入サンプルと比較した。

その結果、アンチセンスオリゴ導入後20時間でELOVL2の発現 (RNA) はコントロール (リバーズ) オリゴヌクレオチド導入時 (100%) に比べ56%に減少していた。また、導入後3日目でのアポトーシスはコントロール (100%) に比べ210%に増加していた。

これより、ELOVL2の発現を抑制するとがん細胞はアポトーシスを起こして細胞死を起こすことが確認された。

## 実施例 5

### (1) ELOVL2高発現MCF-7細胞株の取得

6ウェルプレートに、ヒト乳がん細胞株MCF-7 (ATCC) を $1.1 \times 10^6$ 個播種した。一晚培養後、FuGene6 (Roche社) を用いて、実施例3で得られたpcDNA3.1(+)-ELOVL

2を導入した。一晚培養後、ジェネティシン (Invitrogen社) を培地に加え3日間培養した。その後、細胞を回収し希釈して96ウェルプレート15枚に播種しなおし、3日毎に培地交換を行った。15日後にシングルコロニーを形成している96細胞株を24ウェルプレートに2ウェルずつ播種しなおし、さらに6日間培養した。

- 5 2ウェルに播種した細胞のうち1ウェルから細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen社) を用いて添付のプロトコールに従ってRNAを抽出し、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem社) を用いてcDNAを調製した。2種のプライマー (配列番号: 12および配列番号: 13) を用いてELOVL2遺伝子の発現量を、また補正のためにTaqMan human  $\beta$ -actin control reagent (Applied Biosystem社) を用いて $\beta$ アクトチン発現量を見ることとし、ABI7700 (Applied Biosystem社) のマニュアルに従いPCRを行った。ELOVL2遺伝子の発現量を測定する際の該反応における反応液の組成は、SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystem社) を7.5  $\mu$ l、上記で調製したcDNAテンプレートを滅菌蒸留水で3倍に希釈したものを5  $\mu$ l、2種のプライマー (配列番号: 12および配列番号: 13) を各0.5  $\mu$ M
- 10 となるように加え、15  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、50°C2分、95°C10分の後、95°C15秒、60°C1分のサイクルを40回繰り返した。ELOVL2遺伝子の発現量は $\beta$ アクトチン発現量で補正して比較した。この結果、MCF-7細胞株と比較して、26倍、34倍のELOVL2高発現を示す細胞株を2株選択し、それぞれMCF7-ELOVL2-C2およびMCF7-ELOVL2-C12と命名した。

20

## (2) ELOVL2高発現MCF-7細胞株での細胞増殖能の亢進

- 上記実施例5 (1) で作製したMCF7-ELOVL2-C2、MCF7-ELOVL2-C12およびMCF-7細胞を $1 \times 10^2$ 個ずつ96ウェルプレートに播種した。1日後および7日後にCell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて、添付プロトコールに従い、生細胞数を計測した。その結果、MCF7-ELOVL2-C2およびMCF7-ELOVL2-C12細胞ではMCF-7細胞と比較し、それぞれ3.1倍および2.3倍、細胞増殖速度が亢進していることが確認された。
- 25

## (3) ELOVL2高発現MCF-7細胞株での足場非依存的な細胞増殖能の亢進

D-MEM培地 (invitrogen社) 粉末を通常より2倍濃い濃度で滅菌水に溶解し、2×D-MEM培地を作製した。これに1.2%アガロース (BMA社) 溶液を等量加え、終濃度0.6%アガロース/1×D-MEM培地を作製し、6ウェルプレートに3mlずつ分注し、室温で15分間静置し、0.6%寒天培地を作製した。上記実施例5 (1) で作製したMCF7-ELOVL2-C2、MCF7-ELOVL2-C12およびMCF-7細胞を $1.2 \times 10^4$ 個ずつ懸濁した2×D-MEM培地に、0.7%アガロース (BMA社) 溶液を等量加え (終濃度0.35%アガロース)、先に作製した0.6%寒天培地上に3mlずつ分注し、室温で15分間静置し0.35%寒天培地を作製した。これを37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で3週間培養し、形成されたコロニーの大きさ、数、培地の色を調べることでコロニー形成能とした。

その結果、MCF7-ELOVL2-C2およびMCF7-ELOVL2-C12は、MCF7細胞に比較し、コロニー形成能が亢進していることが確認された。

#### 実施例6

##### 15 ELOVL2高発現MCF-7細胞株でのMAPKのリン酸化の亢進

実施例5 (1) で作製したMCF7-ELOVL2-C2、MCF7-ELOVL2-C12およびMCF-7細胞を $5 \times 10^5$ 個ずつ10cmシャーレに播種した。4晩培養後、培地を除きプロテアーゼインヒビターとして20mlあたり1錠のComplete Mini (Roche社) を、フォスファターゼインヒビターとして1000分の1量のPHOSPHATASE INHIBITOR COCKTAIL II (SIGMA)を含むRIPA バッファー (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton-100, 0.1% SDS, 1% Deoxycholic acid) を200μlずつ添加し、細胞をはがし1.5mlのエッペンチューブに入れた。これを4°Cで緩やかにローテーションさせながら30分間インキュベーションした後、15000rpmで10分間遠心し、上清を得た。上清から一部を取り、BCA Protein Assay Kit (PIERCE社) を用いて添付プロトコールに従いタンパク含量を測定した。残りの上清にLaemmli Sample Buffer (BIO-RAD) を加え、95°Cで3分間インキュベートした。タンパク量をそろえたサンプルを、常法に従いSDS-PAGE、Western blottingを行った。Blottingされたメンブレンは定法に従いブロッキングした後、一次抗体は抗マウス抗リン酸化MAPK抗体 (Santa Cruz) で、二次抗体はperoxidase-conjugated 抗マウスIgG抗体 (Jackson. I

mmunoReserch社)で反応させ、検出はECL Western Blotting Detection System (Amersham社)で行った。定法に従い、同メンブランをstrippingした後、一次抗体は抗ラビットMAPK抗体 (Santa Cruz) で、二次抗体はperoxidase-conjugated 抗ラビットIgG抗体 (Jackson. ImmunoReserch社) で反応させ、検出はECL Western Blotting Detection System (Amersham社)で行った。その結果、MCF-7細胞に比較し、MCF7-ELOVL2-C2およびMCF7-ELOVL2-C12では、MAPKのリン酸化が亢進していることが確認された。

#### 実施例 7

##### 10 (1) FLAG tag付き動物発現ベクターの作製

2種のプライマーを設計 (配列番号: 14および配列番号: 15) し、実施例3で得られたpcDNA3.1-ELOVL2をtemplateとし、ExTaq (宝酒造) を用いたPCR反応を行った。該反応は94℃ 1分の後、94℃ 10秒、55℃ 30秒、72℃ 1分30秒のサイクルを31回繰り返した。得られた増幅産物をXbaI、EcoRIで切断し、同酵素で切断した  
15 プラスミドベクターp3xFLAG-CMV10 (SIGMA社) へTaKaRa Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて挿入し、プラスミドベクターp3xFLAG10-ELOVL2を得た。

##### (2) ELOVL2の脂肪酸延長活性

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株CHO細胞株 (ATCC) を10cmディッシュ  
20 に $1 \times 10^6$ 個播種した。一晚培養後、FuGene6 (Roche社) を用いて、上記(1)で得られたp3xFLAG10-ELOVL2またはp3xFLAG10ベクター (SIGMA社) を導入した。一晚培養後、細胞を回収し、プロテアーゼインヒビターとして20mlあたり1錠のComplete Mini (Roche社) を含むバッファーA (10mM Tris-HCl, 0.25Mショ糖, 1mM EDTA) に懸濁させた。ポリトロンホモジナイザーにて細胞を破碎し、600重力加  
25 速度で4℃で10分間遠心した。この上清を10100重力加速度で4℃で20分間遠心した。さらに、その上清を126000重力加速度で30分間遠心した。得られた沈澱を20mlあたり1錠のComplete Mini (Roche社) を含むバッファーB (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 20%グリセロール) で懸濁し、これを酵素源とした。

基質脂肪酸として100  $\mu$ M 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acidを含む脂肪酸

延長活性反応液〔50mMリン酸化カリウム/水酸化ナトリウム(pH6.5)、5 $\mu$ M ロテノン (和光純薬)、100 $\mu$ M CoA (和光純薬)、1mM ATP、1mM NADPH、1mM 塩化マグネシウム、1 $\mu$ l 185kBq [2-<sup>14</sup>C]-マロニルCoA (Amercham BioScience社)〕を調整し、37°Cで1分間インキュベートした。その後、上記酵素源をタンパク質量として50 $\mu$ g加え、攪拌後、37°Cで20分間インキュベートした。該反応液の総量は100 $\mu$ lとした。該反応液に、10%メタノールを含む5M KOH (和光純薬)を100 $\mu$ l添加し、65°Cで1時間インキュベート後、5M HClを100 $\mu$ l添加し、さらに100 $\mu$ l エタノールを添加、攪拌した。最後にヘキサン 500 $\mu$ lを添加し、激しく懸濁し、上層のヘキサン400 $\mu$ lを分別して、シンチレーターA (和光純薬) 30mlを含む標準バイアル瓶に加えて攪拌した。液体シンチレーションカウンター (Aloka社) で<sup>14</sup>Cの放射活性を測定した。

その結果、コントロール (p3xFLAG10ベクターを導入した細胞から調製した酵素源) と比較して、p3xFLAG10-ELOVL2を導入した細胞から調製した酵素源を用いた群では、3.8倍の放射活性を示した。

## 実施例 8

### (1) ELOVL2高発現CHO細胞株の取得

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株CHO細胞株 (ATCC) を10cmディッシュに1 $\times$ 10<sup>6</sup>個播種した。一晚培養後、FuGene6 (Roche社) を用いて、実施例 7 (1) で得られたp3xFLAG10-ELOVL2ベクターまたはp3xFLAG10ベクター (SIGMA社) を導入した。一晚培養後、500 $\mu$ g/mlのジェネティシン (invitrogen社) を含む培地に交換し、更に1週間培養を行い、ELOVL2の安定発現CHO細胞株を得た。更にこれを限外希釈法により、モノクローナル細胞株を作製し、CHO-ELOVL2細胞株と命名した。

### (2) ハイスループットELOVL2酵素活性測定法の構築

プロテアーゼインヒビターとして20mlあたり1錠のComplete Mini (Roche社) を含むバッファーB (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 20%グリセロール) に上記 (1) で作製したCHO-ELOVL2細胞を懸濁させた。ソニケーションにて細胞を破碎し

、600重力加速度で4℃で10分間遠心し上清を得た。この細胞抽出液を酵素源とした。

基質脂肪酸として100  $\mu$ M 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acidを含む脂肪酸延長活性反応液 [50mMリン酸化カリウム/水酸化ナトリウム (pH6.5)、5  $\mu$ M ロテノン (和光純薬)、100  $\mu$ M CoA (和光純薬)、1mM ATP、1mM NADPH、1mM 塩化マグネシウム、1  $\mu$ l 185kBq [2- $^{14}$ C]-マロニルCoA (Amercham BioScience社)] を調整し、この反応液90  $\mu$ lを96ウェルプレートに分注し、37℃で1分間インキュベートした。その後、上記酵素源をタンパク質量として15  $\mu$ g (10  $\mu$ l) 加え攪拌した後、37℃で60分間インキュベートした。その後、トリクロロ酢酸を4%となるように加え、攪拌した。この反応生成物をHarvexter (Packard) を用いてUnifilter-96 GF/C (Packard) で回収し、microscinti-20 (ParkinElmer) を20  $\mu$ l加え、攪拌後TopCount (Packard) により $^{14}$ Cの放射活性を測定した。

その結果、コントロール (p3xFLAG10ベクターを導入した細胞から調製した酵素源) と比較して、p3xFLAG10-ELOVL2を導入した細胞から調製した酵素源を用いた群では、5.2倍の放射活性を示し、実施例7で測定した延長活性と同等以上の感度を持つことが確認できた。

### (3) ELOVL2の脂肪酸延長活性の基質特異性

実施例8 (1) で得られたELOVL2高発現CHO細胞株由来の細胞抽出液を用いて、実施例8 (2) のハイスループットELOVL2酵素活性測定法を使用し、cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid、cis-7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic acid、cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid、Arachidonyl-CoA、cis-7, 10, 13, 16-docosatetraenoic acid、およびcis-5, 8, 11-eicosatrienoic acidを基質としてELOVL2の脂肪酸延長活性を測定した。

これより、上記脂肪酸は、ELOVL2の基質であることがわかった。

## 実施例9

### スクリーニング

実施例8 (2) の方法で得られた細胞抽出液を酵素液としてスクリーニング実

験を行う。

基質脂肪酸として100  $\mu$ M 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acidを含む脂肪酸  
延長活性反応液 [50mMリン酸化カリウム/水酸化ナトリウム (pH6.5)、5  $\mu$ M ロ  
テノン (和光純薬)、100  $\mu$ M CoA (和光純薬)、1mM ATP、1mM NADPH、1mM 塩化  
5 マグネシウム、1  $\mu$ l] を調製し、この反応液 90  $\mu$ lを96ウェルプレートに分注  
、37°Cで1分間インキュベートする。ここで、上記酵素液 10  $\mu$ Lおよび試験化合  
物のDMF溶液 2  $\mu$ Lを添加する。最後に1  $\mu$ L 185kBq [2-<sup>14</sup>C]-マロニルCoA (Amers  
ham BioScience社) を混和することによりELOVL2酵素反応を開始し、37°Cで60分  
間インキュベートする。その後、トリクロロ酢酸を4%となるように加え、攪拌  
10 後、反応生成物をHarvester (Packard) を用いてUnifilter-96 GF/C (Packard  
) で回収し、microscinti-20 (ParkinElmer) 20  $\mu$ L添加、攪拌後、TopCount (P  
ackard) により<sup>14</sup>Cの放射活性を測定する。

試験化合物を含まないDMF液を添加した場合の活性を100とし、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>値) を求めることができる。より低いIC<sub>50</sub>値を与える化合物を、本発明のタ  
15 ンパク質の活性を阻害する化合物として選択する。

#### 実施例 10

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞死

被験細胞細胞としてELOVL2をほとんど発現していない大腸がん細胞株SW480、  
20 前立腺がん由来細胞株LNCap細胞およびELOVL2を発現している前立腺がん由来細胞株PC-3を用いて、実施例 4 と同様の方法で、ELOVL2のアンチセンスオリゴヌクレオチドのアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

その結果、MCF7細胞と同様、PC-3細胞でもアポトーシス効果による細胞死が認められたが、ELOVL2をほとんど発現していないSW480細胞、LNCap細胞ではこのよ  
25 うなアポトーシス効果による細胞死は認められなかった。

#### 実施例 11

(1) 変異型p53ベクターの構築

野生型p53の翻訳開始コドンATGのAから数えて524番目の塩基をGからAに置換し

たフォワード側およびリバース側のプライマー（配列番号：19および配列番号：20）を作製した。野生型p53（WTp53）（Genbank Accession No. AF136270）をpcDNA3.1ベクター（Invitrogen）のBam HI- Eco RIサイトに組み込み、pcDNA3.1-WTp53ベクターを得た。このpcDNA3.1-WTp53ベクターを鋳型として、上記2種類5のプライマーを使用し、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGENE）を用いて変異型p53（MTp53）遺伝子を作製した。方法は添付プロトコールに従った。これをBam HI とEco RIで制限酵素処理し、同酵素で処理したpIND vector（Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System（invitrogen）に添付）に組み込み、pIND-MTp53 vectorを得た。この変異型p53は、175番目のアミノ酸10配列が、アルギニン（R）からヒスチジン（H）に置換している。コントロールとして野生型p53遺伝子をpIND vectorに組み込んだpIND-WTp53 vectorも調製した。もう一つのコントロールとしてCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）が組み込まれたpIND-CAT vector（invitrogen）も使用した。

### 15 （2）変異型p53遺伝子発現制御細胞の構築

p53が欠失している肺がん由来細胞株H1299（ATCC）を6cmシャーレに $4 \times 10^5$ 個播種し、一晚培養後、Fugene6を用いて、添付プロトコールに従い、上記（1）で得られたpIND-MTp53 vector、pIND-WTp53 vector、pIND-CAT vectorを、pVgRXR vector [Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System（Invitrogen）に20添付]とco-transfectionした。ジェネティシン（GIBCO BRL）とZeosin（Invitrogen）により、それぞれの遺伝子の導入細胞株H1299-MTp53、H1299-WTp53、およびH1299-CATを選択した。これらH1299-MTp53、H1299-WTp53の安定発現株は、 $5 \mu$ MのMuristerone A（Invitrogen）添加で、それぞれ、MTp53および WTp53の発現が誘導されることを、抗p53抗体（Oncogene）を用いてウェスタンブロッティング法で確認した。25

### （3）GeneChip解析

変異型p53によって発現誘導される遺伝子群を明らかにするため、 $5 \mu$ M Muristerone Aを添加後、48時間後のH1299-MTp53、H1299-WTp53、H1299-CATから調製し



たtotal RNAを材料とし、GeneChip (Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社) を用いて遺伝子発現解析を行った。また、23種類の正常組織から抽出されたtotal RNA (表3) を材料とし、同様に遺伝子発現解析を行った。実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical manual) に従った。

その結果、変異型p53の発現を誘導したH1299細胞 (H1299-Mtp53 (48hr)) において、野生型p53の発現を誘導したH1299細胞およびCATの発現を誘導したH1299細胞 [H1299-Wtp53 (48hr) およびH1299-CAT (48hr)] に比較し、発現が増加している遺伝子としてSTAU2遺伝子を見出した。この遺伝子は正常組織では、その発現量が検出限界以下であった (表4)。

表3

	RNAを抽出した組織	販売元
	小腸	Clontech社
15	前立腺	Clontech社
	脂肪	BioChain Institute社
	骨格筋	Clontech社
	心臓	Clontech社
	腎臓	Clontech社
20	副腎	Clontech社
	肝臓	Clontech社
	膵臓	Clontech社
	脾臓	Clontech社
	気管	Clontech社
25	肺	Clontech社
	全脳	Clontech社
	小脳	Clontech社
	胸腺	Clontech社
	乳腺	Clontech社

	唾液腺	Clontech社
	胃	Clontech社
	直腸	BioChain Institute社
	大腸	BioChain Institute社
5	子宮	Clontech社
	子宮頸	BioChain Institute社
	精巢	Clontech社

---

表 4

10	組織	遺伝子発現量 <sup>a</sup>
	小腸	ND
	前立腺	ND
	脂肪	ND
	骨格筋	ND
15	心臓	ND
	腎臓	ND
	副腎	ND
	肝臓	ND
	膵臓	ND
20	脾臓	ND
	気管	ND
	肺	ND
	全脳	ND
	小脳	ND
25	胸腺	ND
	乳腺	ND
	唾液腺	ND
	胃	ND
	直腸	ND

	大腸	ND
	子宮	ND
	子宮頸	ND
	精巣	ND
5	H1299-Mtp53 (48hr)	0.9
	H1299-Wtp53 (48hr)	ND
	<u>H1299-CAT (48hr)</u>	<u>ND</u>

\*遺伝子発現量は、Genechipで発現が検出された全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

10 ND; not detected

## 実施例 1 2

ヒト乳がんmatched pairにおけるSTAU2遺伝子発現量の検討

15 ヒト乳がん患者の癌組織および正常組織由来のmatched pair cDNA (Clontech 社) を鋳型として用い、STAU2遺伝子発現量の検討を行った。2種類のプライマー (配列番号: 2 1 および配列番号: 2 2) を用いてPCR反応を行うことにより、がん組織と正常組織でのSTAU2遺伝子の発現量比較を行った。

その結果、STAU2遺伝子の癌組織での発現が、正常組織に比較し顕著である患者が確認された。

20

## 実施例 1 3

### (1) 動物細胞発現ベクターの構築

25 Genbank BC008369に記載されているSTAU2遺伝子の配列を基にして2種類のプライマー (配列番号: 2 3 および配列番号: 2 4) を作成し、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用いて5  $\mu$  M Muristerone Aを添加したH1299-MTp53 から調製したcDNAを鋳型としてPCRを行いDNA断片を得た。この遺伝子断片およびpCDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen)を、制限酵素EcoRVおよびNotIで切断し、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 (宝酒造)を用いて結合させ、得られたプラスミドDNAを公知の方法により大腸菌DH5  $\alpha$ に導入し、形質転換体 (クローン) を得た。この形質転

換体からプラスミドを抽出しシークエンサー (Applied Biosystem社:ABI3100) を用いてインサート部分の塩基配列を確認し、動物細胞発現ベクターpCDNA3.1(+)-STAU2を構築した。

## 5 (2) STAU2遺伝子による細胞増殖効果

6ウェルプレート各ウェルに、ヒト肺癌細胞株H1299(ATCC)を $1.1 \times 10^5$ 個ずつ播種し、24時間培養後、FuGene6 (Roche)を用いて添付のプロトコールに従い、上記(1)で得られたpCDNA3.1(+)-STAU2およびpCDNA3.1(+)-LacZ (Invitrogen)を導入した。24時間培養後、ジェネティシン (Invitrogen)を培地に加えて6日間培養した。その後、細胞を6cmシャーレに播種しなおして、さらにジェネティシンを添加した培地で3週間細胞を培養した。PBSで洗浄後、10%中性ホルマリン溶液 (和光純薬) にて室温で30分間固定し、PBSで洗浄した。その後、クリスタルバイオレット (SIGMA) 溶液 (クリスタルバイオレットが10%になるようエタノールで溶解し、それをPBSで100倍に希釈したもの) で細胞を室温下、2時間染色し、蒸留水にて洗浄し風乾させた。染色された細胞の面積をImagProアプリケーション (Media Cybernetics社) で測定した。その結果、H1299細胞にpCDNA3.1(+)-LacZを導入した群の面積を100%とすると、pCDNA3.1(+)-STAU2を導入した群の面積は110% ( $P < 0.01$ ) であった。このことからSTAU2遺伝子は細胞増殖能を促進させることが確認された。

20

### 実施例 14

#### アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞死

STAU2遺伝子のアポトーシスに及ぼす影響を解析するために、STAU2アンチセンスオリゴヌクレオチド導入実験を行った。

25 まず、配列番号: 18で表される塩基配列に対するアンチセンス (配列番号: 25) を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた (Amersham Pharmacia Biotech)。コントロールオリゴヌクレオチドとしては、配列番号: 25で表される塩基配列のリバーズ配列 (配列番号: 26) を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた (Amersham Pha

rmacia Biotech)。

被験細胞として肺癌細胞株A549（大日本製薬）を用い、オリゴヌクレオチド導入前日に、 $3.3 \times 10^3$ 個の細胞を96ウェルプレート（Falcon社）に播種した。オリゴヌクレオチド導入にはOligofectAMINE（Invitrogen社）を使用し、そのプロト

5 コールに従った。アンチセンスオリゴヌクレオチド導入後3日目にCell death detection ELISA（Roche社）を用いてコントロールオリゴ導入サンプルと比較した。アポトーシスはコントロール（100%）に比べ167%に増加していた。

これより、STAU2の発現を抑制することにより、癌細胞はアポトーシスを起こして、細胞死を起こすことが確認された。

10

#### 産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質は、癌細胞に特異的に発現し、癌の診断マーカーであり、したがって、該タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、大腸癌、乳

15 癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤として安全に使用することができる。好ましくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤である。さらに、該タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば

20 、アポトーシス促進剤として安全に使用することもできる。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドや抗体は、本発明で用いられるタンパク質の発現を阻害することができ、例えば大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍などの癌の予防・治療剤（好ま

25 しくは、乳癌、前立腺癌などの予防・治療剤）として、あるいはアポトーシス促進剤として安全に使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。
2. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。
3. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。
4. 配列番号：10で表される塩基配列を有する請求項3記載のアンチセンスポリヌクレオチド。
5. 請求項3記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
6. 癌の予防・治療剤である請求項5記載の医薬。
7. 請求項3記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
8. 癌の診断薬である請求項7記載の診断薬。
9. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
10. 請求項9記載の抗体を含有してなる医薬。
11. 癌の予防・治療剤である請求項10記載の医薬。
12. 請求項9記載の抗体を含有してなる診断薬。
13. 癌の診断薬である請求項12記載の診断薬。
14. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌の診断薬。
15. 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、

脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である請求項 1、請求項 2、請求項 6 または請求項 11 記載の予防・治療剤。

16. 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、  
5 脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である請求項 8、請求項 13 または請求項 14 記載の診断薬。

17. ELOVL2 の活性を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

18. ELOVL2 の発現を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。  
10

19. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

20. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット。  
15

21. 請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

22. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。  
20

23. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット  
25

24. 請求項 22 記載のスクリーニング方法または請求項 23 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

25. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を

阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤。

26. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤。

5 27. 請求項3記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス促進剤。

28. 請求項9記載の抗体を含有してなるアポトーシス促進剤。

29. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

30. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

31. 哺乳動物に対して、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。

32. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法。

33. 癌の予防・治療剤を製造するための、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用。

34. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。



35. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。
36. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。
37. 配列番号：25で表される塩基配列を有する請求項36記載のアンチセンスポリヌクレオチド。
- 10 38. 請求項36記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
39. 癌の予防・治療剤である請求項38記載の医薬。
40. 請求項36記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
41. 癌の診断薬である請求項40記載の診断薬。
42. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 15 43. 請求項42記載の抗体を含有してなる医薬。
44. 癌の予防・治療剤である請求項43記載の医薬。
45. 請求項42記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 20 46. 癌の診断薬である請求項45記載の診断薬。
47. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌の診断薬。
48. 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌または血液腫瘍である請求項34、請求項35、請求項39または請求項44記載の予防・治療剤。
- 25 49. 癌が、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌ま

たは血液腫瘍である請求項 4 1、請求項 4 6 または請求項 4 7 記載の診断薬。

50. Staufen homolog 2の活性を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

5 51. Staufen homolog 2の発現を阻害する作用を有する化合物またはその塩を含有してなる癌の予防・治療剤。

52. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

10 53. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

54. 項52記載のスクリーニング方法または請求項53記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

15 55. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

20 56. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

57. 請求項55記載のスクリーニング方法または請求項56記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる癌の予防・治療剤。

25 58. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤。

59. 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス促進剤。

60. 請求項36記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなるアポトー

シス促進剤。

6 1. 請求項 4 2 記載の抗体を含有してなるアポトーシス促進剤。

6 2. 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

6 3. 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

6 4. 哺乳動物に対して、配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。

6 5. 配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法。

6 6. 癌の予防・治療剤を製造するための、配列番号：1 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用。

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Preventing and treating agent for cancer

<130> P03-0038PCT

<150> JP 2002-186799

<151> 2002-06-26

<150> JP 2002-186815

<151> 2002-06-26

<160> 26

<210> 1

<211> 296

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Glu His Leu Lys Ala Phe Asp Asp Glu Ile Asn Ala Phe Leu Asp  
5 10 15  
Asn Met Phe Gly Pro Arg Asp Ser Arg Val Arg Gly Trp Phe Thr Leu  
20 25 30  
Asp Ser Tyr Leu Pro Thr Phe Phe Leu Thr Val Met Tyr Leu Leu Ser  
35 40 45  
Ile Trp Leu Gly Asn Lys Tyr Met Lys Asn Arg Pro Ala Leu Ser Leu  
50 55 60  
Arg Gly Ile Leu Thr Leu Tyr Asn Leu Gly Ile Thr Leu Leu Ser Ala  
65 70 75 80  
Tyr Met Leu Ala Glu Leu Ile Leu Ser Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn  
85 90 95  
Leu Gln Cys Gln Asp Leu Thr Ser Ala Gly Glu Ala Asp Ile Arg Val  
100 105 110

2/16

Ala Lys Val Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Ser Val Glu Phe Leu  
 115 120 125  
 Asp Thr Ile Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Thr Ser Gln Ile Thr Phe  
 130 135 140  
 Leu His Val Tyr His His Ala Ser Met Phe Asn Ile Trp Trp Cys Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Trp Ile Pro Cys Gly Gln Ser Phe Phe Gly Pro Thr Leu Asn  
 165 170 175  
 Ser Phe Val His Ile Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Val Phe  
 180 185 190  
 Pro Ser Met His Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Gln Ala  
 195 200 205  
 Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Thr Ile Thr His Thr Met Ser Ala Val  
 210 215 220  
 Val Lys Pro Cys Gly Phe Pro Phe Gly Cys Leu Ile Phe Gln Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Tyr Met Leu Thr Leu Val Ile Leu Phe Leu Asn Phe Tyr Val Gln Thr  
 245 250 255  
 Tyr Arg Lys Lys Pro Met Lys Lys Asp Met Gln Glu Pro Pro Ala Gly  
 260 265 270  
 Lys Glu Val Lys Asn Gly Phe Ser Lys Ala Tyr Phe Thr Ala Ala Asn  
 275 280 285  
 Gly Val Met Asn Lys Lys Ala Gln  
 290 295

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 888

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atggaacatc taaaggcctt tgatgatgaa atcaatgctt ttttggacaa tatgtttgga 60  
 ccgcgagatt ctcgagtcag aggggtggttc acgttggact cttaccttcc tacctttttt 120  
 cttactgtca tgatatctgct ctcaatatgg ctgggtaaca agtatatgaa gaacagacct 180  
 gctctttctc tcaggggtat cctcaccttg tataatcttg gaatcacact tctctccgcg 240  
 tacatgctgg cagagctcat tctctccact tgggaaggag gctacaactt acagtgtcaa 300

```

gatcttacca ggcagggga agctgacatc cgggtagcca aggtgctttg gtggtactat 360
ttctccaaat cagtagagtt cctggacaca attttcttcg ttttgcgga aaaaacgagt 420
cagattactt ttcttcatgt atatcatcat gcttctatgt ttaacatctg gtggtgtgtc 480
ttgaactgga taccttgtgg acaaagtttc tttggaccaa cactgaacag ttttgtccac 540
attcttatgt actcctacta tggactttct gtgtttccat ctatgcacaa gtatctttgg 600
tggaagaaat atctcacaca ggctcagctg gtgcagttcg tgctcaccat cagcacacc 660
atgagcgccg tcgtgaaacc gtgtggcttc cccttcggtt gtctcatctt ccagtcatct 720
tatatgctaa cgtagtcat cctcttctta aatttttatg ttcagacata ccgaaaaaag 780
ccaatgaaga aagatatgca agagccacct gcagggaaag aagtgaagaa tggtttttcc 840
aaagcctact tactgcagc aaatggagtg atgaacaaga aagcaca 888

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4002

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

gatagcgccg ggcagaggga cccggctacc ctggacagcg catcgccgcc cgcccgggtc 60
gccgcgccac agccgctgcg gatcatggaa catctaaagg ctttgatga tgaaatcaat 120
gcttttttgg acaatatgtt tggaccgcga gattctcgag tcagagggtg gttcacgttg 180
gactcitacc ttctacctt ttttcttact gtcattgtatc tgctctcaat atggctgggt 240
aacaagtata tgaagaacag acctgctctt tctctcaggg gtatcctcac cttgtataat 300
cttggaatca cacttctctc cgcgtacatg ctggcagagc tcattctctc cacttgggaa 360
ggaggctaca acttacagtg tcaagatctt accagcgagc gggaagctga catccgggta 420
gccaaagtg c tttgggtgta ctatttctcc aaatcagtag agttcctgga cacaattttc 480
ttcgttttgc ggaaaaaac gagtcagatt acttttcttc atgtatatca tcatgcttct 540
atgtttaaca tctgggtggtg tgtcttgaac tggatacctt gtggacaaag tttctttgga 600
ccaacactga acagttttgt ccacattctt atgtactcct actatggact ttctgtgttt 660
ccatctatgc acaagtatct ttgggtggaag aaatactca cacaggctca gctggtgcag 720
ttcgtgctca ccacacgca caccatgagc gccgtcgtga aaccgtgtgg cttcccttc 780
ggttgctca tcttccagtc atcttatatg ctaacgttag tcatcctctt cttaaatttt 840
tatgttcaga cataccgaaa aaagccaatg aagaaagata tgcaagagcc acctgcaggg 900
aaagaagtga agaatggttt ttccaaagcc tacttcactg cagcaaatgg agtgatgaac 960
aagaaagcac aataaaaatg agtaacagaa aaagcacata tactagccta acagattggc 1020
ttgttttaaa gcaaagactg aattgaaggt tacatgtttt aggataaact aatttctttt 1080
gagttcataa atcatttgta ccagaatgt attaatatat tgctattagg ttaatctgtt 1140

```

aactgaatgc ttigatcagc attgaggtga tgctcacctc cgaggacctc agaactggtg 1200  
cagcttctct ctccctccct cccacagact gaacctttcg ccagaagctg tccttataac 1260  
gccttatacg catacacagc caggaaacgt ggagcattgt ttctcacaga gagtctccaa 1320  
ataaaaaggg ttttgttcag attaaaatgt ttacaacaaa atgttaatta tattctaaat 1380  
acagggtatg ttctaatacta tattaagcaa taatgccagt gcataatcat tccatttggt 1440  
ccttttagcaa tcaacccagc aaaatattaa aatgggatca tacacagaag atagaaaaat 1500  
ctagcaaac ttctcttct gtaagccaga gtcttgtcta tcagattccc acaaccactc 1560  
ctgattctaa atttagtgat atggtaatga aattggtatt tattttaaat attagttatt 1620  
ctaaggagaa aaaaatgctt ctgcaagatt ttcataattc aggggctgtg gataggattg 1680  
ttcctctgtt tccctaataca ttcatctgtt catgtctccc tcttggtcca gtcagcctag 1740  
gttatacaga tgccatgctc cacaccacga gcagtgtaca aatctggctg cccgtttact 1800  
ttctgagcaa gcaactggagt ccactccgac ctttttcttt gaacatgcat gctgctggaa 1860  
tatgtataaa tcagaactag cagaagtagc agagtgatgg gagcaaaata ggcaactgaat 1920  
tcgtcaactc tttttgtga gcctacttgt gaatattacc tcagatacct gttgtcactc 1980  
ttcacaggtt atttaagttt ttgaagctgg gagaaaaag atggagtagc ttggaaagat 2040  
tccagcaactg agccgtgggc cggatcatgag ccacgataaa aaatgccagt ttggcaaaact 2100  
cagcaactcct gttccctgct caggtatatg cgatctctac tgagaagcaa gcacaaaagt 2160  
agacaaaagt attaatgagt atttcctttc tccataagtg caggactgtt actcactact 2220  
aaactctacc aagaatggaa acaaagaata ttttctgaag atttttttga agatttaattt 2280  
ataccctata aaataaaaact tgtagcttc gatgaagtca cttcatcttc tctcctacct 2340  
tattttttta aataagtttt taggtcctga cactgacatc aaatacatgc acaccagaaa 2400  
ggcatttcca ccaccgtccc cactcattag cgtccagagt gcctttctct ctcggtttt 2460  
tttccccct gagctctagt tttaaacttt ctctgttaa aaaaattgta cttttatttc 2520  
atgtaaaactg cccctctgag gatttgggca tattttttgg aaggtgccta atgcttagga 2580  
tagtctctag ggtgatgcac tgcacctgct tccttccctt cagtgcggcc gaccatttc 2640  
tgttgaacag atgtctcctg tgtgatgcc ctgactctta catttatctt tctaaatcat 2700  
tttctgaagc tgacttgctc tagggtgctt catcaccact tccatcttgc atcaccttat 2760  
aactgttctg tcttgttctc tcccagcaat ttatttttaa acaagggcta gcttcaagca 2820  
tgactgttaa tggctcctct gtgacaaaac acaagttgga ccaaggagaa agccctttgg 2880  
agaaaactgga ccctagttca gtttagatct caaatatagg ctgaaatctc ttaccaaagt 2940  
gcgttccaga taaaaatgag acttagaaga cagactgggc taatatgctc actggtcatc 3000  
acattcagct tattcttacg tgccagttag gccctaaggt ctcagtgcac agcatacctg 3060  
ccactctgga tgttttctg ggcttcatat ctgtatggca aggaggagc tgtccttcag 3120  
cagacaaaagt caagcagctt taagtacaag gcagcttgaa acctctctga tgaaagtga 3180  
aaatgtgggt agcttatact ttcaactaa tgccagtgc tagagagagg tttcattcat 3240  
gatgtgtatt tccaatttgg tcttcaattc aagagatgct tcataaaaca cttatagcct 3300

taaaccattc aagggtctaat taaaaaata gttatgaaat cttagccaca aaaaataaat . 3360  
caggtaaaca ttttaacctg tcgttaagtg ttgtaacttc aaaaaaccaa aatgccttatt 3420  
ttaatgtgat ttttctaaaa ctattgaaaa attaatattt ctataatcta ttaaaaaaaa 3480  
tggaagaatgt tttctctcaa atttcctctg acccatggga atgaaaatac ttaaatactg 3540  
taaagcatat ctattaataa ttccccaat tttttaaact aacaaaatgg aatgttaact 3600  
gaatggaatt aaacatagca attgtcaagc catcaaaatt atatatcgaa ccacttaggc 3660  
atgttacggg gtaaagtcct caccctcgca ttgagaaat attttattat ttttatttta 3720  
aggcaaaaca gtgtttactg tgatgggcag aacagccttt tgtatctagg agtccatttg 3780  
agttctttcc aatatttcca tatcgttcat aaatgtgtct gggggcttcc ttgtttggaa 3840  
aatatggata tcgctttgtt ttcctttgaa agtaattata tcttaagaac atagtatcat 3900  
gaatggagta gacagggagg ctgcagaagc catttctctt tgtagataaa aagcattatc 3960  
tatgattgtt gtataataaa ttgattttta cattaaaaaa aa 4002

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

atgacggagg ttgtgaggca ctgccccac catgagcgc 39

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

gcgctcatgg tgggggcagt gcctcacaac ctccgtcat 39

<210> 6



6/16

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 6

cctgtcggtta agtgttgtaa cttc

24

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 7

attgtttaat tccattcagt taacattcc

29

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

ccggaattca tggaacatct aaaggccttt gatgatg

37

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

ccggcggcgcg cttattgtgc tttcttggtc atcactcca

39

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense oligonucleotide designed for ELOVL2

<400> 10

agccacacgg tttcacgacg

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

gcagcacttt ggcacaccga

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

gctcaccatc acgcacacca t

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

aaccgaaggg gaagccacac

20

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

gcgaattcag aacatctaaa ggcctttgat gatgaaatc

39

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

cgtctagatt attgtgcttt ctgtttcatc actccattt

39

9/16

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 479

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

Met Leu Gln Ile Asn Gln Met Phe Ser Val Gln Leu Ser Leu Gly Glu  
5 10 15  
Gln Thr Trp Glu Ser Glu Gly Ser Ser Ile Lys Lys Ala Gln Gln Ala  
20 25 30  
Val Ala Asn Lys Ala Leu Thr Glu Ser Thr Leu Pro Lys Pro Val Gln  
35 40 45  
Lys Pro Pro Lys Ser Asn Val Asn Asn Asn Pro Gly Ser Ile Thr Pro  
50 55 60  
Thr Val Glu Leu Asn Gly Leu Ala Met Lys Arg Gly Glu Pro Ala Ile  
65 70 75 80  
Tyr Arg Pro Leu Asp Pro Lys Pro Phe Pro Asn Tyr Arg Ala Asn Tyr  
85 90 95  
Asn Phe Arg Gly Met Tyr Asn Gln Arg Tyr His Cys Pro Val Pro Lys  
100 105 110  
Ile Phe Tyr Val Gln Leu Thr Val Gly Asn Asn Glu Phe Phe Gly Glu  
115 120 125  
Gly Lys Thr Arg Gln Ala Ala Arg His Asn Ala Ala Met Lys Ala Leu  
130 135 140  
Gln Ala Leu Gln Asn Glu Pro Ile Pro Glu Arg Ser Pro Gln Asn Gly  
145 150 155 160  
Glu Ser Gly Lys Asp Met Asp Asp Asp Lys Asp Ala Asn Lys Ser Glu  
165 170 175  
Ile Ser Leu Val Phe Glu Ile Ala Leu Lys Arg Asn Met Pro Val Ser  
180 185 190  
Phe Glu Val Ile Lys Glu Ser Gly Pro Pro His Met Lys Ser Phe Val  
195 200 205  
Thr Arg Val Ser Val Gly Glu Phe Ser Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ser  
210 215 220  
Lys Lys Leu Ser Lys Lys Arg Ala Ala Thr Thr Val Leu Gln Glu Leu

10/16

225                      230                      235                      240  
Lys Lys Leu Pro Pro Leu Pro Val Val Glu Lys Pro Lys Leu Phe Phe  
                         245                      250                      255  
Lys Lys Arg Pro Lys Thr Ile Val Lys Ala Gly Pro Glu Tyr Gly Gln  
                         260                      265                      270  
Gly Met Asn Pro Ile Ser Arg Leu Ala Gln Ile Gln Gln Ala Lys Lys  
                         275                      280                      285  
Glu Lys Glu Pro Asp Tyr Val Leu Leu Ser Glu Arg Gly Met Pro Arg  
                         290                      295                      300  
Arg Arg Glu Phe Val Met Gln Val Lys Val Gly Asn Glu Val Ala Thr  
305                      310                      315                      320  
Gly Thr Gly Pro Asn Lys Lys Ile Ala Lys Lys Asn Ala Ala Glu Ala  
                         325                      330                      335  
Met Leu Leu Gln Leu Gly Tyr Lys Ala Ser Thr Asn Leu Gln Asp Gln  
                         340                      345                      350  
Leu Glu Lys Thr Gly Glu Asn Lys Gly Trp Ser Gly Pro Lys Pro Gly  
                         355                      360                      365  
Phe Pro Glu Pro Thr Asn Asn Thr Pro Lys Gly Ile Leu His Leu Ser  
370                      375                      380  
Pro Asp Val Tyr Gln Glu Met Glu Ala Ser Arg His Lys Val Ile Ser  
385                      390                      395                      400  
Gly Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Ser Pro Lys Asp Met Asn Gln Pro Ser  
                         405                      410                      415  
Ser Ser Phe Phe Ser Ile Ser Pro Thr Ser Asn Ser Ser Ala Thr Ile  
                         420                      425                      430  
Ala Arg Glu Leu Leu Met Asn Gly Thr Ser Ser Thr Ala Glu Ala Ile  
                         435                      440                      445  
Gly Leu Lys Gly Ser Ser Pro Thr Pro Pro Cys Ser Pro Val Gln Pro  
                         450                      455                      460  
Ser Lys Gln Leu Glu Tyr Leu Ala Arg Ile Gln Gly Phe Gln Val  
465                      470                      475

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1437

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 17

atgcttcaaa taaatcagat gttctcagtg cagctgagtc ttggtgagca gacatgggaa 60  
tccgaaggca gcagtataaa gaaggctcag caggctgttg ccaataaagc tttgactgaa 120  
tctacgcttc ccaaaccagt tcagaagcca cccaaaagta atgttaacaa taaccaggc 180  
agtataactc caactgtgga actgaatggg cttgctatga aaaggggaga gcctgccatc 240  
tacaggccat tagatccaaa gccattccca aattatagag ctaattacaa ctttcggggc 300  
atgtacaatc agaggatatca ttgccagtg cctaagatct tttatgttca gctcactgta 360  
ggaaataatg aatTTTTTgg ggaaggaaag actcgacaag ctgctagaca caatgctgca 420  
atgaaagccc tccaagcact gcagaatgaa cctattccag aaagatctcc tcagaatggt 480  
gaatcaggaa aggatatgga tgatgacaaa gatgcaaata agtctgagat cagcttagtg 540  
tttgaaattg ctctgaagcg aaatatgcct gtcagttttg aggttattaa agaaagtgga 600  
ccaccacata tgaaaagctt tgttactcga gtgtcagtag gagagtctc tgcagaagga 660  
gaaggaaata gcaaaaaact ctccaagaag cgcgctgcga ccaccgtctt acaggagctt 720  
aaaaaacttc cacctcttcc tgtggtggaa aagccaaaac tattttttaa aaaacgccct 780  
aaaacaatag taaaggccgg accagaatat ggccaaggga tgaaccctat tagccgcctg 840  
gcgcaaattc aacaggccaa aaaggaaaag gagccggatt atgttttgct ttcagaaaga 900  
ggaatgcctc gacgtcgaga atttgtgatg caggatgaagg taggcaatga agttgctaca 960  
ggaacaggac ctaataaaaa gatagccaaa aaaaatgctg cagaagcaat gctgttacaa 1020  
cttggttata aagcatccac taatcttcag gatcaacttg agaagacagg ggaaaacaaa 1080  
ggatggagtg gtccaaagcc tgggtttcct gaaccaacaa ataatactcc aaaaggaatt 1140  
cttcatttgt ctctgatgt ttatcaagag atggaagcca gccgccacaa agtaatctct 1200  
ggcactactc taggctatit gtcacccaaa gatatgaacc aaccttcaag ctctttcttc 1260  
agtatatctc ccacatcgaa tagttcagct acaattgccg gggaactcct tatgaatgga 1320  
acatcttcta cagctgaagc cataggttta aaaggaagt ctctactcc cccttgttct 1380  
ccagtacaac cttcaaaaca actggaatat ttagcaagga ttcaaggctt tcaggta 1437

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 4058

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 18

ccaatgttgg agccgtctgc aaagtgtccc cggcaagaag aggctgccta ccacaaggac 60  
tttagcttac tttttaaaga ttgaagaaaa aaaagaagac agaaaaagaa gaactcaaag 120  
atacacaag taatttgaac caaggctcag aagtttttgg agccgtgagg gatacagcag 180

12/16

tttgggtcaat attgtcttaa catgcttcaa ataaatcaga tgttctcagt gcagctgagt 240  
cttgggtgagc agacatggga atccgaaggc agcagtataa agaaggctca gcaggctgtt 300  
gccaataaag ctttgactga atctacgctt cccaaaccag ttcagaagcc acccaaaagt 360  
aatgttaaca ataaccaggc cagtataact ccaactgttg aactgaatgg gcttgctatg 420  
aaaaggggag agcctgccat ctacaggcca ttagatccaa agccattccc aaattataga 480  
gctaattaca actttcgggg catgtacaat cagaggtatc attgcccagt gcctaagatc 540  
ttttatgttc agctcactgt aggaataaat gaattttttg gggaaggaaa gactcgacaa 600  
gctgctagac acaatgctgc aatgaaagcc ctccaagcac tgcagaatga acctattcca 660  
gaaagatctc ctcagaatgg tgaatcagga aaggatatgg atgatgacaa agatgcaa at 720  
aagtctgaga tcagcttagt gtttgaaatt gctctgaagc gaaatatgcc tgtcagtttt 780  
gaggttatta aagaaagtgg accaccacat atgaaaagct ttgttactcg agtgtcagta 840  
ggagagtctc ctgcagaagg agaaggaaat agcaaaaaac tctccaagaa gcgcgctgcg 900  
accaccgtct tacaggagct taaaaaactt ccacctcttc ctgtgggtgga aaagccaaaa 960  
ctatttttta aaaaacgccc taaaacaata gtaaaggccg gaccagaata tggccaaggg 1020  
atgaacccta ttagccgcct ggcgcaaat caacaggcca aaaaggaaaa ggagccggat 1080  
tatgttttgc tttcagaaag aggaatgcct cgacgtcgag aatttgtgat gcaggtgaag 1140  
gtaggcaatg aagtgtctac aggaacagga cctaataaaa agatagccaa aaaaaatgct 1200  
gcagaagcaa tgctgttaca acttggttat aaagcatcca ctaatcttca ggatcaactt 1260  
gagaagacag gggaaaacaa aggatggagt ggtccaaagc ctgggtttcc tgaaccaaca 1320  
aataatactc caaaaggaat tcttcatttg tctcctgatg tttatcaaga gatggaagcc 1380  
agccgccaca aagtaatctc tggcactact ctaggtatt tgtcaccaca agatatgaac 1440  
caaccttcaa gctctttctt cagtatatct cccacatga atagttcagc tacaattgcc 1500  
agggaactcc ttatgaatgg aacatcttct acagctgaag ccataggttt aaaaggaagt 1560  
tctcctactc cccctgttcc tccagtacaa cttcaaaaac aactggaata tttagcaagg 1620  
attcaaggct ttcaggtatg aattaaaagc aaaaacaaaa aacaaaacaa ttcattagcc 1680  
tcagattctt catctgtata catcacaagg ctcatcttg cctgctagta tggcctacat 1740  
gccacttacg ttttaagtta tttaggaaca caaaggacag acaaaaaagc catatgcaca 1800  
tgctcattt tctcttattt ttgatctatc tagtaattct tttgctgcct gtctcttctc 1860  
cattttcctt cttctttttt aagcattttt catattcttc actgtcttct atttggctt 1920  
gattaggtgc atctatctct tcgctctgtc ttccacaaac aaaaattctg ccttcagaca 1980  
tttgggtgta gtatttcaca ctcagttctc ctttttttta cataaggatt gaggttcttt 2040  
ttatgatgat ttaccttta tagcaatttt gaattttgca ttctgttgct agtattgatt 2100  
caggtacacc attaagatac aacattctag aagtctatta ccttaggagt taattaaaca 2160  
tgatatttga agaataatga aatgctttat agttgtttga ggcataacaa tgtgtatttg 2220  
ttttactgga tcatgttttg aactgactag ggagggtagc acctgcctca gatagtacca 2280  
acaattctgt ttactgggt agtctaaaac tagcttatag tttacttaa cttgttgtgt 2340

13/16

atgtgaattt agggatggaa actttttttc ccctatttat tctttgtttc cttctgggaa 2400  
aaaacccac aaaaatcagc actcctttat ggatacattg gagcttttga aagaattgta 2460  
aactctagga aggggaaata tctgtgtctt gatttcttag ttgccttgaa aatcatgtac 2520  
tgaactgtaa ccgctaactt gactggatga actagtttgc ttgtgtgtag agagtgtatt 2580  
gcttcctcag atttcactgt tticactctc ttttccatct tagtctttat tccttaagac 2640  
caaaaactgt aatatccttt agaaatgctc tagaagatct gtattgtgta gaatgatcat 2700  
gtatttataa atatttttaca agtttagatt ataaaatgaa aaagaaggtc atgtgttttg 2760  
gggggtattt tgcattgttc gatttttttt tcccttcacc gaacccttct gattccttca 2820  
aactattgcc aggtagtgtt tagtgtttct aattggactc ttaatatgaa cttcaagaag 2880  
ctgttaccag ttatcggctc tgtcatctga aattttaacc acttaattta aagttacaat 2940  
tttagaattt gtttttggtt ttttacctta agaaacacaa taaatcactg tttaaaaaag 3000  
atctcaattt atataaagta ctggaaaaaa gctaagtaat ttttagttct atctataatc 3060  
tccgtaggat gaattagaaa taaattgtga tgaaaagaaa ttaactgctt atttatgaat 3120  
ctaatacatt agaaatgtct gagagtaaca ctgcattctt atagaaacaa agcacaaatt 3180  
gcattcaagc tctgaattga ttttttgctt ggagctgttg ttacagtagc tgtaattttg 3240  
ctaccagaat gtcttaattt tttaaatttg tttttatttc taagctcttg gcaatgacaa 3300  
taattataat tttacatat ctctactgta gtcaacatgt agagtctgct tccctcatta 3360  
ttgcattgct aaggcctttt taaaaagctt atgcttacat aatatactct tttttatgga 3420  
cacgttatat gtttccaaat ctgtgtattg tgatttttac atactaatga atataaacag 3480  
gtgattttta aatattactg tgcttctttg gttgaatgag ctggtattga tgtaaaatac 3540  
tctgtcattg atggaccact acctgcagct aagcagtgag cagaatctcc gggaaatgac 3600  
ttagtctggc cacatgcata gcccatcttc ataatgtcgc agcagaaggt tctttgtggt 3660  
taaaagtttt aaagcctatt tctttatagg taaccctctc aggtatatatt acctggtaga 3720  
aaaacatgta gattgtttct attacttaaa tgttttaatt ggactgtagt ttagaaatta 3780  
caggaccagc ttgttacaga ttatacacta ttctgttact tttatttctg aaacttaaaa 3840  
acaataaatt ctttttctgt gtttctaggt tagaactttt ttattttatt gcacactgaa 3900  
cagatactgt tgcttattga atattgtgta aacccttctt tggctttcct tgccattgac 3960  
aatttgattt aagcctacta gagccattgt atgtgacagc tatattgtat taaaaagtaa 4020  
aatatatga gtgtattgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4058

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;



<223> Primer

<400> 19

atgacggagg ttgtgaggca ctgccccac catgagcgc

39

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

gcgctcatgg tgggggcagt gcctcacaac ctccgtcat

39

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

agagaaagcg gacaataacc ag

22

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

ccaagggaaa tgctcaaagt

20

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

ccgatatcat gcttcaaata aatcagatgt tctcagtc

39

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

ttgcggccgc tcagacggcc gagttgatt tcttgc

36

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense oligonucleotide designed for STAU2

<400> 25

gcaccacgac aaaacaatca

20

<210> 26

16/16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

actaaca aaa cagcaccacg

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08036

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K38/17, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C07K16/32, C12Q1/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K38/17, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C07K16/32, C12Q1/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	LEONARD, A.E. et al., 'Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes.', Lipids, August 2002, Vol.37, No.8, pages 733 to 740, full text; RN: 500740-54-5	1-30, 33
P, X	WO 02/99122 A1 (EXELIXIS INC.), 12 December, 2002 (12.12.02), Full text; RN: 478332-77-3 (SEQ.NO.23) (Family: none)	1-30, 33
P, X	WO 02/62975 A2 (BAYER AG.), 15 August, 2002 (15.08.02), Full text; RN: 448315-38-6, 448315-47-7, 448315-37-5, 448315-39-7, 448319-38-8, 448319-39-9, 448319-40-2 (Family: none)	1-30, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 October, 2003 (02.10.03) Date of mailing of the international search report 21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08036

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02/62974 A2 (BAYER AG.), 15 August, 2002 (15.08.02), Full text; particularly, Claims; Fig. 9 (Family: none)	1-30, 33
X	WO 01/60860 A2 (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE INC.), 23 August, 2001 (23.08.01), Full text; RN: 438390-53-5, 438380-21-3, 438368-38-8, 438409-57-5 & AU 2001/41541 B	1-30, 33, 36, 37
X	WO 02/44320 A2 (XENON GENETICS), 06 June, 2002 (06.06.02), Full text; particularly, Claims; Fig. 4, ELG3 & AU 2002/21404 B	1-30, 33-63, 66
X	WO 02/8401 A2 (ABBOTT LAB), 31 January, 2002 (31.01.02), Full text; Fig. 64AB, MEL04 & AU 2001/77982 B & US 2002/138874 A & EP 1309699 A2	1-30, 33
X	WO 00/70945 A2 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB.), 30 November, 2000 (30.11.00), Full text; Fig. 6, SSC2 & AU 2000/53941 B	1-30, 33
X	TRACY, A., Human DNA sequence from clone RP1-62D2 on chromosome 6., GenBank, 15 November, 2001 (15. 11.01), Accession AL121955	3, 4
P, X	DUCHAIINE, T.F. et al., 'Staufen 2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles.', J.Cell. Sci., 15 August, 2002 (15.08.02), Vol.15, part 16, pages 3285 to 3295	34-63, 66
P, X	WO 02/102235 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC.), 27 December, 2002 (27.12.02), Full text; RN: 251882-62-9 & US 2003/124579 A	34-63, 66
P, X	WO 01/53454 A2 (HYSEQ INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text; RN: 528641-21-6, 528630-18-4 & AU 2001/27344 B & EP 1250346 A2 & US 6569662 A	34-63, 66
P, X	WO 02/86443 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC.), 31 October, 2002 (31.10.02), Full text; RN: 251882-62-9 (Family: none)	34-63, 66

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08036

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02/81638 A2 (ORIGENE TECHNOLOGIES INC.), 17 October, 2002 (17.10.02), Full text; RN: 473377-79-6, 473376-46-4 (Family: none)	34-63, 66
P,X	WO 02/59377 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC.), 01 August, 2002 (01.08.02), Full text; RN: 251882-62-9 (Family: none)	34-63, 66
X	CAMARGO, A.A. et al., 'The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome.', Proc.Natl.acad.Sci.USA, 2001, Vol.98, No.21, pages 12103 to 12108, full text; RN: 313928-33-5	34-63, 66
X	STRAUSGERG, R.L. et al., 'Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.', Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 11 December, 2002 (11.12.02), Vol.99, No.26, pages 16899 to 16903, full text; RN: 483710-57-2, 480772-02-9, 480772-03-0, 339778-94-8, 339778-95-9	34-63, 66
X	WO 01/53312 A1 (HYSEQ INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text; RN: 256915-31-8, 350862-54-3 & AU 2001/27284 B & EP 1242443 A1 & US 2002/197679 A	34-63, 66
X	WO 01/66733 A1 (CHIBA PREFECTURE), 13 September, 2001 (13.09.01), Full text; RN: 404036-51-7 & WO 01/66719 A1 & JP 2001-245671 A & JP 2001-321175 A & AU 2001/36059 B & EP 1262547 A1	36, 37
X	WO 01/42467 A2 (MILLENIUM PREDICTIVE MEDICINE INC.), 14 June, 2001 (14.06.01), Full text; RN: 349674-55-1 & AU 2001/20742 B	36, 37
A	MARION, R.M. et al., 'Human sequence homologue of stauferin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum.', Mol.Cell.Biol., 1999, Vol.19, No.3, pages 2212 to 2219	34-63, 66
A	BUCHNER, G. et al., 'Identification of a novel homolog of the Drosophila stauferin protein in the chromosome 8q13-q21.1 region.', Genomics, 1999, Vol.62, No.1, pages 113 to 118	34-63, 66

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08036

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 31, 32, 64, 65

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 31, 32, 64 and 65 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims 1 to 33 relate to ELOVL2 represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, while the inventions as set forth in claims 34 to 66 relate to STAU2 represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO:16. However, the amino acid sequences of these proteins are not considered as being highly homologous with each other. As reported by, for example, the document cited in the international search report, a protein and its gene corresponding to the definition of claim 1, a protein and its gene corresponding to the definition of claim 34, etc. had been already known before the priority date of the present case. Furthermore, there had been already known before the priority date of the present case a gene showing elevated expression in a cancer tissue and a mutated p53-induced gene as described in the description (p.2, lines 15-17) of the present case other than the ELOVL2 gene STAU2.

Such being the case, the technical matter common to these groups of inventions cannot be considered as being characteristic compared with the technical level at the point of the application of the present case. Thus, there is no technical relevancy involving any special technical features between these groups of inventions and thus they are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## &lt;&lt;Subject of search&gt;&gt;

[1]

The following claims relate to preventives/remedies for cancer containing compounds respectively defined by the desired properties as described below:

- \* [1] "a compound or its salt inhibiting the activity of - - - a protein - - - represented by SEQ ID NO:1": claims 1, 15, 25 and 33;
- \* [2] "a compound or its salt inhibiting the expression of a gene of - - - a protein - - - represented by SEQ ID NO:1": claims 2, 15, 26 and 33;
- \* [3] "a compound or its salt having an effect of inhibiting the activity of ELOVL2": claim 17;
- \* [4] "a compound or its salt having an effect of inhibiting the expression of ELOVL2": claim 18;
- \* [5] "a compound or its salt inhibiting the activity of - - - a protein - - - represented by SEQ ID NO:16": claims 34, 48, 58 and 66;
- \* [6] "a compound or its salt inhibiting the expression of a gene of - - - a protein - - - represented by SEQ ID NO:16": claims 35, 49, 59 and 66;
- \* [7] "a compound or its salt having an effect of inhibiting the activity of Staufin homolog 2": claim 50; and
- \* [8] "a compound or its salt having an effect of inhibiting the expression of staufin homolog 2": claim 51.

Although each claim involves any compounds having such a property, it is recognized that only part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as described in PCT Article 5.

(continued to extra sheet)



Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scopes of these compounds or salts thereof having the above properties cannot be specified. Thus, the above claims each fails to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6 too.

[2]

The "preventives/remedies for cancer" according to the inventions as set forth in claims 21, 24, 54 and 57 are individually specified by a screening method and, therefore, involve any compounds obtained by the screening method as the active ingredient.

In the description of the present case, however, only few compounds are specifically cited as the active ingredient obtained by the screening method. Thus, each of these claims is neither supported by the description nor disclosed therein.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unclear what specific compounds are involved and what are not. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner.

[3]

Such being the case, the search was made mainly on antisense polynucleotides which are specifically cited in the description as examples of the compounds falling within any of the categories of "a compound or its salt" as defined in [1] or examples of the compounds which are the active ingredients of "preventives/remedies for cancer" as defined in [2].

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K38/17, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C07K16/32, C12Q1/02, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K38/17, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09, C07K16/32, C12Q1/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	LEONARD, A. E. et al. 'Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes.' Lipids, Aug. 2002, vol. 37, no. 8, p. 733-740 文献全体、RN: 500740-54-5	1-30, 33
P, X	WO 02/99122 A1 (EXELIXIS INC) 2002.12.12 文献全体、RN: 4783 32-77-3 (SEQ. NO. 23) (ファミリーなし)	1-30, 33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.10.03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4C

8828



電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 02/62975 A2 (BAYER AG) 2002.08.15 文献全体、RN: 448315-38-6, 448315-47-7, 448315-37-5, 448315-39-7, 448319-38-8, 448319-39-9, 448319-40-2 (ファミリーなし)	1-30, 33
P, X	WO 02/62974 A2 (BAYER AG) 2002.08.15 文献全体、特にclaims, Fig. 9 (ファミリーなし)	1-30, 33
X	WO 01/60860 A2 (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE INC) 2001.08.23 文献全体、RN: 438390-53-5, 438380-21-3, 438368-38-8, 438409-57-5 & AU 2001/41541 B	1-30, 33, 36, 37
X	WO 02/44320 A2 (XENON GENETICS) 2002.06.06 文献全体、特にclaims、FIGURE4のELG3 & AU 22002/21404 B	1-30, 33-63, 66
X	WO 02/8401 A2 (ABBOTT LAB) 2002.01.31 文献全体、Fig. 64ABのMELO4 & AU 2001/77982 B & US 2002/138874 A & EP 1309699 A2	1-30, 33
X	WO 00/70945 A2 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB) 2000.11.30 文献全体、FIGURE6のSSC2 & AU 2000/53941 B	1-30, 33
X	TRACY, A. Human DNA sequence from clone RP1-62D2 on chromosome 6., GenBank, 15.11月.2001(15.11.01) Accession AL121955	3, 4
P, X	DUCHAINED, T.F. et al. 'Staufen 2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles.' J. Cell Sci., 15 Aug.2002, vol.15, part 16, p. 3285-3295	34-63, 66

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 02/102235 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 2002.12.27 文献 全体、RN: 251882-62-9 & US 2003/124579 A	34-63, 66
P, X	WO 01/53454 A2 (HYSEQ INC) 2001.07.26 文献全体、RN: 528641 -21-6, 528630-18-4 & AU 2001/27344 B & EP 1250346 A2 & US 6569662 A	34-63, 66
P, X	WO 02/86443 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 2002.10.31 文献 全体、RN: 251882-62-9 (ファミリーなし)	34-63, 66
P, X	WO 02/81638 A2 (ORIGENE TECHNOLOGIES INC) 2002.10.17 文献全体、RN: 473377-79-6, 473376-46-4 (ファミリーなし)	34-63, 66
P, X	WO 02/59377 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 2002.08.01 文献全体、RN: 251882-62-9 (ファミリーなし)	34-63, 66
X	CAMARGO, A. A. et al. 'The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, vol. 98, no. 21, p. 12103-12108 文献全体、RN: 313928-33-5	34-63, 66
X	STRAUSGERG, R. L. et al. 'Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11 Dec. 2002, vol. 99, no. 26, p. 16899-16903 文献全体、RN: 483710-57-2, 480772-02-9, 480772-03-0, 339778-94-8, 339778-95-9	34-63, 66
X	WO 01/53312 A1 (HYSEQ INC) 2001.07.26 文献全体、RN: 25691 5-31-8, 350862-54-3 & AU 2001/27284 B & EP 1242443 A1 & US 2002/197679 A	34-63, 66
X	WO 01/66733 A1 (CHIBA PREFECTURE) 2001.09.13 文献全体、RN : 404036-51-7 & WO 01/66719 A1 & JP 2001-245671 A & JP 2001-321175 A & AU 2001/36059 B EP 1262547 A1	36, 37
X	WO 01/42467 A2 (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE INC) 2001.06. 14 文献全体、RN: 349674-55-1 & AU 2001/20742 B	36, 37

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MARION, R. M. et al. 'Human sequence homologue of stauferin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum.' Mol. Cell. Biol., 1999, vol.19, no.3, p.2212-2219	34-63, 66
A	BUCHNER, G. et al. 'Identification of a novel homolog of the Drosophila stauferin protein in the chromosome 8q13-q21.1 region.' Genomics, 1999, vol.62, no.1, p.113-118	34-63, 66

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 31, 32, 64, 65 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 31, 32, 64, 65 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT 規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## &lt;&lt;第II欄の続き&gt;&gt;

請求の範囲1-33の発明群は、いずれも配列番号：1のアミノ酸配列で表されるELOVL2に関するものであり、請求の範囲34-66の発明群は、いずれも配列番号：16のアミノ酸配列で表されるSTAU2に関するものであるが、両者のタンパク間で、そのアミノ酸配列の相同性が格別高いとはいえない。また、請求の範囲1の規定に該当するタンパク質及びその遺伝子、請求の範囲34の規定に該当するタンパク質及びその遺伝子、等はいずれも、例えば国際調査報告で挙げた文献に記載されているように本願優先日前既知であるし、またELOVL2遺伝子STAU2以外にも、本願明細書p.2第15-17行にいう、癌組織において発現が増加する遺伝子もしくは変異型p53誘導遺伝子、もまた本願優先日前既知である。

よって、両発明群が共有する技術的事項は、本願出願時の技術水準と比較して特徴的なものとはいえないから、両発明群は特別な技術的特徴を含む技術的な関係を互いに有しているとはいえず、互いに単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものではない。

## &lt;&lt;調査の対象について&gt;&gt;

## 【1】

- ・請求の範囲1、15、25、33は、  
[1] 「配列番号：1で表される…タンパク質…の活性を阻害する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲2、15、26、33は、  
[2] 「配列番号：1で表される…タンパク質…の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲17は、  
[3] 「ELOVL2の活性を阻害する作用を有する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲18は、  
[4] 「ELOVL2の発現を阻害する作用を有する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲34、48、58、66は、  
[5] 「配列番号：16で表される…タンパク質…の活性を阻害する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲35、49、59、66は、  
[6] 「配列番号：16で表される…タンパク質…の遺伝子の発現を阻害する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲50は、  
[7] 「Staufen homolog 2の活性を阻害する作用を有する化合物又はその塩」
- ・請求の範囲51は、  
[8] 「staufen homolog 2の発現を阻害する作用を有する化合物又はその塩」

という、いずれも所望の性質により定義された化合物を有効成分とする癌の予防・治療剤、診断薬又はアポトーシス促進剤に関するものである。そして、各請求の範囲は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、これら「化合物又はその塩」については、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、上記各請求の範囲はいずれも、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

## 【2】

請求の範囲21, 24, 54, 57の各発明に係る「癌の予防・治療剤」は、いずれもスクリーニング方法によって特定されており、当該スクリーニング方法で得られるあらゆる化合物を有効成分として包含するものである。

しかしながら、本願明細書には、当該スクリーニング方法で得られる上記有効成分として具体的に記載されているものはごくわずかであるから、これらの請求の範囲はいずれも明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。

また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記各請求の範囲の記載は著しく不明確である。

## 【3】

よって、調査は、【1】の「化合物又はその塩」のいずれかに属する化合物の例、もしくは【2】の「癌の予防・治療剤」の有効成分である化合物の例、として明細書に具体的に記載されているアンチセンスポリヌクレオチドについて主に行った。